

Lisensiaattityö

Äidinmaito – terveysjuomaa ja normaalibakteereita



Mari P. Heikkilä

Mikrobiologian osasto

Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos

Helsingin yliopisto

Esipuhe

Tämä lisen­siaattityö sisältää kirjallisuuskatsauksen, johon on koottu viimeisintä tietoa äidinmaidon koostumuksesta ja mikrobiologiasta. Pyrkimyksenä oli tieteellisen tutkimuksen ohella tehdä asiantuntijoille ja terveydenhuollon henkilökunnalle suunnattu selkeä suomenkielinen yhteenveto äidinmaitoon liittyvästä tiedosta, sillä viime vuosina on saatu runsaasti uutta tietoa rinnan rakenteesta, maidon koostumuksesta ja mikrobiologiasta. Tavoitteena on myöhemmin julkaista tämän pohjalta myös yleistajuinen teos äidinmaidosta ja imetyksestä äideille ja kaikille asiasta kiinnostuneille. Kirjoittaja on aiemmin tehnyt aiheesta yleistajuiset kirjoitukset Helsingin Sanomien tiedesivuille (C13, 11.5.2002), Kaksplus-lehteen (sivut 6 - 10, 11/2002) ja Outi Gyldenin toimittamaan "Suomalainen vauvakirja"-teokseen (sivut 247-250, Otava).

Lisen­siaattityön kokeellinen osa, johon kirjallisuuskatsaus toimii samalla johdantona, perustuu yhteen julkaistuun artikkeliin ja siihen liittyviin julkaisemattomiin jatkotutkimuksiin. Tekstissä artikkeliin viitataan roomalaisella numerolla:

- I Heikkilä, M. ja Saris, P. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. J. Appl. Microbiol. 95(3):471-478.

Julkaisemattomat jatkotutkimukset käsittävät *Staphylococcus aureus*-, *Micrococcus luteus*- ja *Listeria innocua* -bakteereita vastaan antimikrobisia yhdisteitä tuottavien bakteerikantojen (n = 450) sekä laktobasillien (n = 6) eristämisen äidinmaidonäytteistä (n = 141), osan isolaateista tunnistamisen (n = 40), sekä inhibition testaamisen eri tavoin. Lisäksi kokeellisessa osassa on kuvattu julkaisemattomat alustavat kokeet ja menetelmävertailut antimikrobisten yhdisteiden konsentroimiseksi, puhdistamiseksi ja karakterisoimiseksi.

Tämä tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksella vuosina 2000 – 2006 professori Per Sariksen ohjaamana. Vuosina 2002 – 2005 kirjoittaja tosin hankki itselleen kenttäkokemusta kahden äitiysloman muodossa. Lisen­siaattityön kirjoittaja suunnitteli pääosin artikkelissa (I) kuvatut kokeet ja teki laboratoriotyöt, lukuun ottamatta Hemen Ibrahimiltä, Anne-Marie Hollandilta ja Ossian Sarikselta saamaansa teknistä apua kantojen eristämisis­sä, inhibitiotestauksissa, DNA-eristyksissä, PCR-ajoissa ja RFLP-analyyseissä. Kirjoittaja analysoi tulokset, kirjoitti artikkelin, suunnitteli pääosin tässä lisen­siaattityössä kuvatut julkaisemattomat jatkotutkimukset ja teki laboratoriotyöt lukuun ottamatta Anne-Marie Hollandilta ja Hemen Ibrahimiltä saamaansa teknistä apua kantojen eristämisis­sä, inhibitiotestauksissa, DNA-

eristyksissä ja PCR-ajoissa, sekä Matti Wahlstenilta saamaansa apua ja ohjeita C18-kiinteäfaasiuutossa ja HPLC-menetelmän käytössä.

Tutkimusta rahoittivat Helsingin yliopiston tutkimusrahasto, Suomen Akatemia, Viikki graduate school for biosciences -tutkijakoulu, Jenny ja Antti Wihurin säätiö sekä Walter Ehrströmin säätiö, joka myönsi matka-apurahan. Tämä työ on osa Suomen Akatemian tieteelliseksi huippuyksiköksi vuosina 2002 – 2007 valitun Mikrobivarojen tutkimusryhmän toimintaa.

6. joulukuuta 2006

Mari Heikkilä

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	7
Lyhenteet.....	9
I Kirjallisuuskatsaus	11
1 Imetyksen anatomia	11
1.1 Rinnan ulkoiset osat	11
1.2 Rinnan sisärakenteet	12
2 Imetyksen fysiologia	14
2.1 Solujen erilaistuminen maidontuottoon (laktogeneesi I)	14
2.2 Runsaan maidonerityksen käynnistyminen (laktogeneesi II)	15
2.2.1 Hormonaaliset muutokset	15
2.2.2 Maidon koostumuksen ja määrän muutokset imetyksen alkuvaiheessa	16
2.2.3 Maitorakkulan epiteelisolujen erityisreitit	17
2.2.4 Tiiviiden liitosten sulkeutuminen	18
3 Maidon koostumus ja määrä	19
3.1 Ravinteet	21
3.1.1 Laktoosi.....	22
3.1.2 Lipidit.....	22
3.1.3 Oligosakkaridit.....	23
3.1.4 Proteiinit.....	24
3.1.5 Kivennäisaineet.....	26
3.1.6 Vitamiinit	27
3.2 Antimikrobiset yhdisteet ja valkosolut	29
3.2.1 Vasta-aineet.....	30
3.2.2 Valkosolut	30
3.2.3 Ravinteet antimikrobisina yhdisteinä.....	31
3.2.4 Oligosakkaridit ja muut glykaanit.....	31
4 Äidinmaidon mikrobit.....	32
4.1 Bakteerien alkuperä.....	33
4.2 Tyypillinen bakteeristo	36
4.2.1 Stafylokokit.....	36
4.2.2 Streptokokit.....	37
4.2.3 Maitohappobakteerit	37
4.3 Patogeenit.....	38
4.3.1 Patogeeniset bakteerit	38
4.3.2 Virukset.....	39
4.3.3 Parasiitit	41
4.4 Rintatulehdus	41
5 Vauvan suolistomikrobisto	43
5.1 Ensimmäiset elinviikot.....	43
5.2 Suolistomikrobisto kuukauden iässä.....	44
5.3 Vieroituksen jälkeen	44
6 Bakteriosiinit.....	45
6.1 Bakteriosiinien luokittelu.....	46
6.2 Toimintatapa	48

6.3 Käyttö elintarvikkeissa ja lääkeaineina	49
II Kokeellisen tutkimuksen tavoitteet	51
III Materiaalit ja menetelmät	52
1 Näytteet	52
2 Bakterikannat	52
3 Bakteerien tunnistaminen	53
4 Antimikrobisen aktiivisuuden mittaaminen	53
4.1 Kerrosagarmenetelmä	53
4.2 Täpläkokeet	53
4.3 Kuoppakoe	54
5 Proteinaasi- ja katalaasikäsittelyt	54
6 Nisiinintuoton määrittäminen	54
7 Bakteriosiinien väkevöinti	54
7.1 Ammoniumsulfaattisaostus	55
7.2 C-18-kiinteäfaasiuutto	55
7.3 Väkevöinti hartsiin	55
8 Trisiini-SDS-PAGE	56
8.1 Näytteiden valmistus	56
8.2 Geelin valmistus, ajo-olosuhteet ja värjäys	56
8.3 Inhibitiotestaukset	57
9 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC	57
IV Tulokset	58
1 Äidinmaidon bakteridiversiteetti	58
2 Bakteerien kyky estää <i>Staph. aureus</i> -bakteerin kasvua	58
2.1 Pesäkeinhibitio	58
2.2 Satunnaisotannan bakteri-isolaattien inhibitiokyky	59
3 Laktobasillit	59
4 Potentiaalisten bakteriosiinintuottajien eristäminen	61
4.1 Antibakteeristen pesäkkeiden yleisyys maitonäytteissä	62
4.2 Inhiboivien bakterikantojen tunnistus	62
5 Antimikrobisten yhdisteiden karakterisointi	63
5.1 Inhibitio maljalla	63
5.2 Nisiinintuotto	66
5.3 Proteiinigeelielektroforeesi	66
5.4 Bakteriosiinien väkevöinti ja HPLC	68
IV Tulosten tarkastelu	73
1 Äidinmaidon bakteridiversiteetti	75
1.1 Stafylokokit	75
1.2 Maitohappobakteerit	78
1.3 Streptokokit	80
1.4 Enterokokit	81
1.5 Muut	81
2 Äidinmaidon bakteerien kyky estää taudinaiheuttajia	82
3 Antibakteeriset yhdisteet	83
3.1 Nisiinintuotto	84
3.2 Proteinaasikäsittelyjen kasvuliemisupernatanttien estovaikutukset	84
3.3 Proteiinigeelielektroforeesi	85
3.4 Väkevöinti ja HPLC	86
V Johtopäätökset	88
VI Ehdotuksia jatkotutkimuksille	89

1 Tähän tutkimukseen liittyvät jatkotutkimukset.....	89
2 Laajemmin aihepiiriin liittyviä jatkotutkimusaiheita.....	90
VII Kiitokset	91
VIII Viitteet.....	93

Tiivistelmä

Äidinmaidon kemiallista koostumusta on viime vuosikymmeninä tutkittu innokkaasti. Siitä on löydetty monia uusia yhdisteitä, jotka tuhoavat bakteereita ja viruksia, sekä edistävät suoliston toimintaa. Mikrobiologinen tutkimus sen sijaan on rajoittunut yksinomaan haitallisten ja tautia aiheuttavien bakteerien ja virusten seulomiseen. Tämä on tärkeää sairaaloiden äidinmaitopankkien käyttöturvallisuutta ajatellen, sillä taudinaiheuttajat voivat olla vaarallisia etenkin keskosina syntyneille vauvoille. Tosin rintamaidon aiheuttamat tulehdukset ovat harvinaisia.

Koska tähän mennessä tutkimukset ovat keskittyneet taudinaiheuttajien seulomiseen, ihmismaidon luonnollista bakteerikoostumusta ei ole juurikaan selvitetty. Osittain tämä johtuu pitkään vallalla olleesta käsityksestä, jonka mukaan äidinmaito on steriiliä. Vaikka maitonäytteissä on hyvin yleisesti, ja toisinaan erittäin runsaasti, harmittomia normaalibakteereita, niitä ei ole pidetty kiinnostavina. Niiden on ajateltu päätyvän näytteisiin ulkopuolelta, lähinnä rinnan iholta.

Tämä tutkimus selvitti terveiden äitien rintamaidon normaalibakteeriston lajikoostumusta, sekä niiden kykyä tuottaa antimikrobisia yhdisteitä taudinaiheuttajia vastaan. Satunnaisotannalla 40:stä äidinmaitonäytteestä eristetyistä 509:stä anaerobisesti kasvaneesta bakteeri-isolaatista yli puolet oli stafylokokkeja, ja lähes kolmannes streptokokkeja. Mediaani-bakteeripitoisuus oli noin 600 pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa. Yleisimmät lajit olivat tyypillinen ihobakteeri *Staphylococcus epidermidis* sekä suubakteerit *Streptococcus salivarius* ja *Streptococcus mitis*. Viidestä näytteestä löytyi maitohappobakteereita, *Lactobacillus*-, *Lactococcus*- ja *Leuconostoc*-sukuisia lajeja, sekä kolmesta näytteestä enterokokkeja. Taudinaiheuttajista *Streptococcus agalactiae* löytyi yhden, ja *Staphylococcus aureus* viiden äidin maidosta, mutta kaikkien vauvat olivat terveitä. Äidinmaidossa mahdollisesti esiintyvät tautia aiheuttavat bakteerit eivät siten näyttäisi aiheuttavan ongelmia terveellä vauvalla.

Keskeisin uusin löydös tässä tutkimuksessa on, että äidinmaidossa esiintyy yleisesti *Staph. aureus*-, *Listeria innocua*- ja *Micrococcus luteus* -bakteerien kasvua estäviä normaalibakteereita. *Staph. aureus* on yleisin rintatulehdusbakteeri, joka voi aiheuttaa vakavia tulehduksia vastasyntyneillä, kuten myös listeria. Bakteerikoostumuksen kartoittamisessa mukana olleista näytteistä noin 90 prosentissa esiintyi *Staph. aureus* -bakteerin kasvua hillitseviä, ja noin 40 prosentissa selvästi estäviä pesäkkeitä. Eristetyistä *Staph. epidermidis* -kannoista viidennes ja *Str. salivarius* -kannoista puolet, sekä maitohappobakteereista ja enterokokeista kaikki estivät tai hillitsivät *Staph. aureus* -bakteerin kasvua. Suuremmasta näytemäärästä (n=141) tehdyissä jatkotutkimuksissa *L. innocua*-, *Staph. aureus*- ja *M. luteus*-bakteerien kasvua estäviä pesäkkeitä löytyi vastaavasti 33, 41 ja 11 prosentista näytteitä.

Viime vuosina ihmiselimistön normaalibakteeristo on noussut yleisesti kiinnostavaksi tutkimusaiheeksi, sillä sen on todettu torjuvan taudinaiheuttajia muun muassa suolistossa, suussa, hengitysteissä, emättimessä ja virsatiehyissä. Tämän tutkimuksen perusteella myös äidinmaidon bakteerit voivat estää taudinaiheuttajia. Bakteriterapiasta, jossa tautia aiheuttavat bakteerit korvataan elimistön hyvillä normaalibakteereilla, toivotaan apuvälinettä erityisesti antibiooteille vastustuskykyisten tulehdusbakteerien tuhoamiseen. Ideana on asettaa bakteerit sotimaan toisiaan vastaan. Erityisen tehokkaita hoitoa ajatellen ovat bakteerikannat, jotka tuottavat taudinaiheuttajia tappavia antimikrobisia yhdisteitä, kuten vetyperoksidia, bakteriosiineja tai happoja.

Tässä tutkimuksessa taudinaiheuttajia estävistä äidinmaidon isolaateista osa tuotti alustavien kokeiden perusteella bakteriosiinien kaltaisia antimikrobisia yhdisteitä. Näistä kahden *Lactococcus lactis* -maitohappobakteerikannan osoitettiin tuottavan nisiini-bakteriosiinia, jota käytetään yleisesti elintarvikkeiden lisäaineena estämässä mm. listeriabakteerien kasvua. Myös muiden bakteriosiinien kaltaisten antimikrobisten yhdisteiden karakterisointi aloitettiin. Työssä esitellään tehtyjä alustavia kokeita ja testattuja menetelmiä, joiden avulla näitä yhdisteitä voidaan jatkossa tunnistaa.

Äidinmaito on maailman vanhin funktionaalinen eli terveysvaikutteinen elintarvike. Tämä tutkimus vahvistaa, että se sisältää myös probiootteja eli terveyttä edistäviä bakteereita. Tämä työ oli päänavaus, jonka jälkeen tutkijat ovat kiinnostuneet äidinmaidon normaalibakteereista, erityisesti maitohappobakteereista. Niille etsitään innokkaasti käyttöä terveyden edistäjinä.

Lyhenteet

aa	aminohappo
AIDS	hankittu immuunipuutosoireyhtymä
ATCC	Amerikan tyyppikantakokoelma
ATP	adenosiinitrifosfaatti
bp	emäspari
B-solut	B-imusolut; puolustusjärjestelmän soluja, joista voi kehittyä plasmakalvoja tai muistikalvoja
%C	N,N'-metyleeni-bis-akryyliamidin (=bisakryyliamidi) prosenttiosuus SDS-PAGE-geelissä suhteessa akryyliamidin ja bisakryyliamidin kokonaismäärään.
CMV	sytomegalovirus
C-terminaalinen	proteiinin/peptidin karboksyyli-päässä oleva
Da	dalton
e.a.	ei analysoitu
GFP	vihreäfluoresoiva proteiini
GRAS	yleisesti turvallisena pidetty organismi
HAMLET	ihmisen alfa-laktalbumiinista muodostuneet johdokset, jotka tappavat syöpäsoluja
HIV	ihmisen immuunikatovirus
HPLC	korkean erottelukyvyn nestekromatografia, (korkeapainenestekromatografia)
HTLV	ihmisen T-soluleukemiavirus
Ig	immunoglobuliini
kcal	kilokalori
kDa	kilodalton
LB	Luria Bertani kasvualusta
LBS	laktobasilleille selektiivinen kasvualusta
M17G	0,1 % (w/v) glukoosia sisältävä M17-kasvualusta
mAU	milliabsorbanssiyksikkö
mOsm	milliosmolaalinen
mM	millimolaarinen eli millimoolia/litra
MRS	de Man, Rogosa ja Sharpe kasvualusta
MRSA	metisilliinille vastustuskykyinen <i>Staphylococcus aureus</i>
M-solut	puolustusjärjestelmään yhteydessä olevia suolen seinämän erilaistuneita mikrolaskostuneita (microfold) epiteelisoluja
MW	molekyyli-paino
NeuAcα2-3Lac	asetyylineuramiinihappo(alfa2-3)laktoosi
NeuAcα2-6Lac	asetyylineuramiinihappo(alfa2-6)laktoosi
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PCR	polymeraasiketjureaktio
pmy	pesäkettä muodostavaa yksikköä
RDA	päivittäinen saantisuositus
RE	retinoliekvivalentti
RFLP	yksilölliset erot restriktioentsyymeillä käsitellyn DNA:n pilkkoutumistuotteiden pituudessa
RNA	ribonukleiinihappo
RP	käänteisfaasi

RSV	respiratory syncytial -virus, hengitystieinfektiovirus
16S rRNA	ribosomaalisen RNA:n 16S-alayksikkö
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
sIgA	liukoinen immunoglobuliini A
TFA	trifluorietikkahappo
T-solut	T-imusolut; puolustusjärjestelmän soluja, joista voi kehittyä tappajasoluja tai auttajasoluja
%T	akryyliamidin ja bisakryyliamidin yhteinen prosenttiosuus (w/v) SDS-PAGE-geelissä
UNAIDS	Yhdistyneiden kansakuntien AIDS-ohjelma
UNICEF	Yhdistyneiden kansakuntien lastenrahasto
VRE	vankomysiinille vastustuskykyinen enterokokki
VZV	Varicella-zoster virus
WHO	Maaailman terveysjärjestö
v/v	tilavuus/tilavuus
w/v	massa/tilavuus

I Kirjallisuuskatsaus

1 Imetyksen anatomia

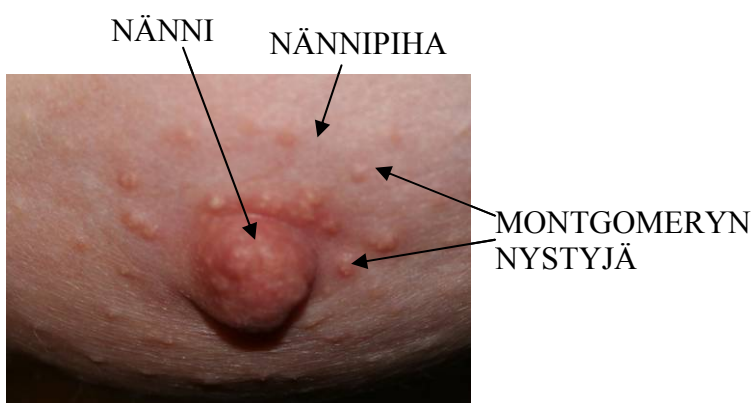
Murrosiässä naisen rinnat kasvavat (mammogenesis) sukupuolihormonien, estrogeenin ja progesteronin, ohjauksessa. Niihin muodostuvat jo tuolloin tyypilliset sisärakenteet, puumaisesti haarautuvat tiehyet. Lopullisen kehityksen maitoa tuottavaksi rauhaseksi ja maitorakkuloiksi käynnistävät kuitenkin vasta raskauden aikaiset hormonaaliset muutokset (katsaus: Fendrick ym. 1998).

1.1 Rinnan ulkoiset osat

Rinnan ulkoiset osat ovat rinnasta kohoava nänni ja sitä ympäröivä tasainen ruskea ihoalue, nännipiha (kuva I.1). Nännipiha ja nänni tummuvat raskauden aikana, jolloin heikkonäköisen vastasyntyneen on helpompi löytää imemiskohta.

Nännipihassa on pieniä, ympäröivän ihon värisiä kimmoisia nystyröitä, joita kutsutaan Montgomeryn nystyiksi tai rauhasiksi. Ne kuuluvat ihon talirauhasiin. Montgomeryn nystyjä ei ole löydetty miehiltä. Nystyt ovat noin 1 – 2 mm kokoisia, niitä on 4 – 24 kehässä nännin ympärillä (Blech ym. 2004).

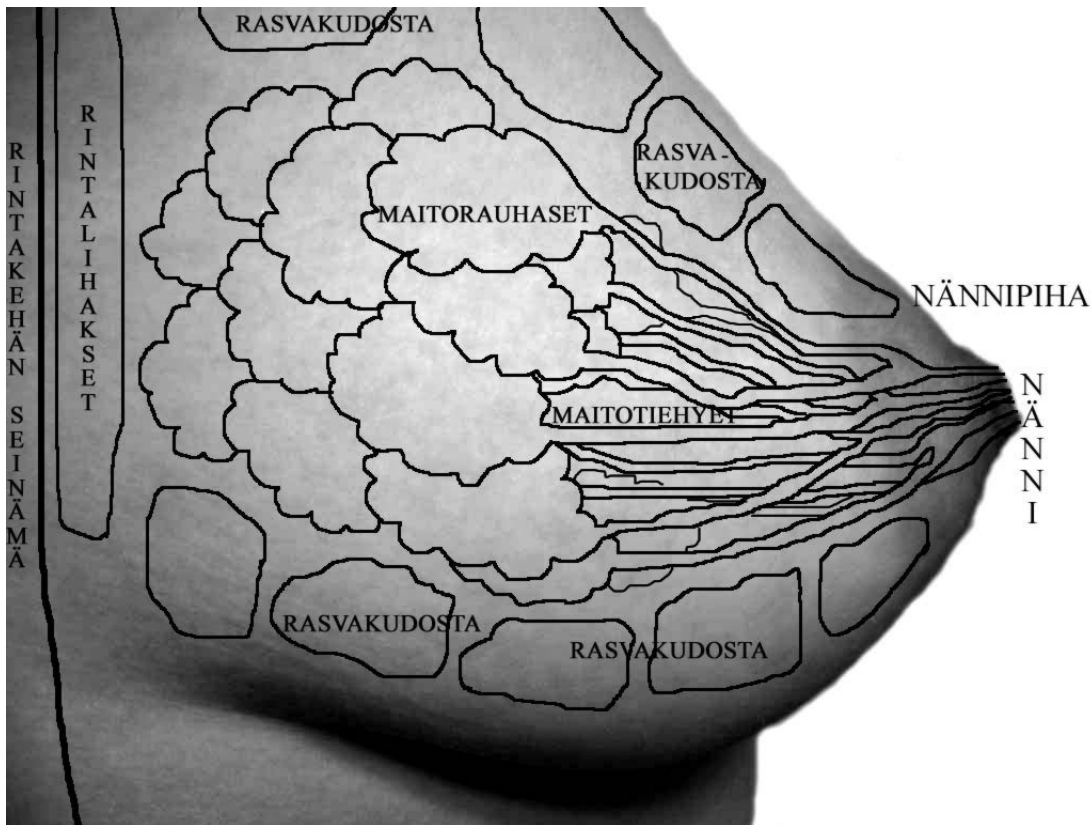
Montgomeryn nystyt kasvavat raskauden ja imetyksen aikana. Ne erittävät liukastavaa öljymäistä ainetta, joka suojaa imetyksen aikana ihoa ja pitää sen joustavana ja kimmoisana. Niistä heruu myös pieni määrä maitoa. Nystyjen toimintaa stimuloi luultavasti estrogeeni, toisin kuin muiden talirauhasten, joiden kasvua kiihdyttää lähinnä testosteroni (Blech ym. 2004).



Kuva I.1 Valokuvassa rinnan ulkoiset osat: nänni ja sitä ympäröivä tumma ihoalue, nännipiha, sekä Montgomeryn nystyt.

1.2 Rinnan sisärakenteet

Naisen rinta, jota kutsutaan myös rintarauhaseksi tai nisäksi, koostuu maitoa tuottavista maitorauhasista ja rasvakudoksesta (kuva I.2). Sen alkuperä on sama kuin hikirauhasten.

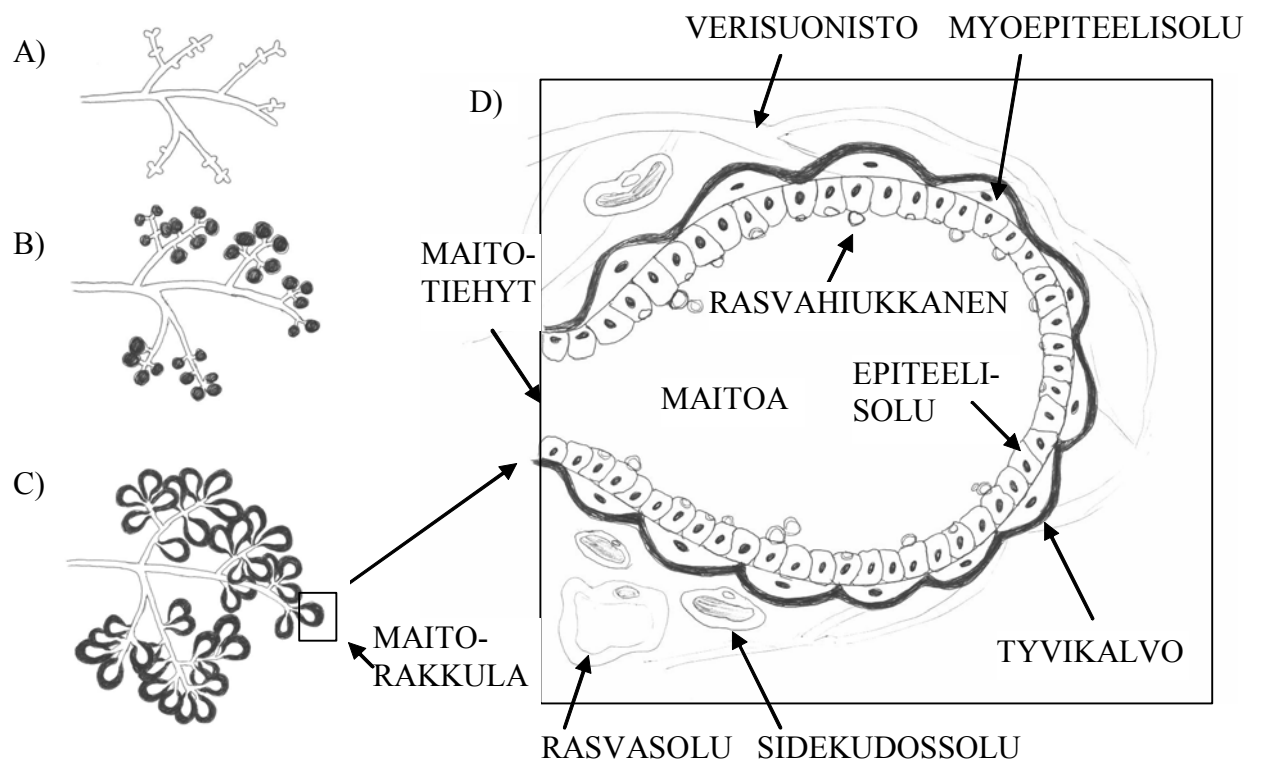


Kuva I.2 Valokuvaan piirrettynä imettävän rinnan sisärakenteet (Ramsayn ym., 2004 ja 2005 mukaan). Maito tuotetaan maitorauhasissa, joista se kulkeutuu maitotiehyitä pitkin nänniin. Rasvakudosta on imetysaikana vähemmän kuin normaalisti, sillä suurentuneet maitorauhaset täyttävät rinnan. Maitorauhasten puumaisesti haaroittuva rakenne on esitelty tarkemmin kuvassa I.3.

Maitorauhaset muodostavat rintaan 15-20 erillistä, itsenäisesti toimivaa lohkoa, joiden välillä on sidekudosta ja rasvasoluja. Maitorauhasten rakenne muistuttaa haarautuvia puita, joissa runkoina ja oksina ovat nännistä alkavat maitotiehyet, ja lehtinä ontelomaiset maitorakkulat eli alveolit (kuva I.3 D). Raskausaikana maitorauhaset kasvavat, jolloin koko rinta täyttyy maidontuotantoon tarvittavista yksiköistä (kuva I.3). Samalla normaalisti rinnassa vallitsevien rasvasolujen määrä vähenee. Vierotuksen jälkeen apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema tuhoaa suurimman osan maitorauhassoluista ja rasvasolut tulevat jälleen vallitseviksi (Cardiff ja Wellings 1999).

Maitorakkuloiden sisäpinnalla on kerros erilaistuneita epiteelisoluja, jotka erittävät maitoa rakkulaan (kuva I.3 D). Myoepiteelisolut verhoavat ulkopintaa. Ne supistuvat imetyksen aikana lihassolujen tavoin, jolloin maito virtaa maitotiehyisiin (McManaman ja Neville 2003).

Myoepiteelisolujen ulkopuolella tyvikalvo ympäröi maitorakkulaa. Sen tehtävänä on varmistaa, etteivät erilaiset yhdisteet verisuonistosta ja soluväli tilasta pääse maitoon. Rakkulan ulkopuolella on hyvin kehittynyt vesisuoniverkosto ja tukirakenne, joka koostuu soluväliaineen komponenteista, sidekudossoluista (fibroblastit) sekä rasvasoluista (adiposyytit) (McManaman ja Neville 2003).



Kuva I.3 Maitorauhasen rakenne ja suurennos maitorakkulasta. A) Normaalisti maitorauhasen tiehyet ovat inaktiivisia. B) Raskausaikana korkeat veren estrogeeni ja prolaktiinipitoisuudet saavat solut jakautumaan aktiivisesti, jolloin maitotiehyet haarautuvat lisää ja maitorakkulat kehittyvät päihin. C) Imetysvaiheessa rakkulat täyttyvät maidosta. D) Maitorakkulaa esittävässä suurennoksessa näkyvät sisäpinnan erikoistuneet epiteelisolut, jotka erittävät rakkulaan maidon komponentteja, kuten proteiineja, laktoosia, kalsiumia ja rasvahiukkasia. Ulkopinnan myoepiteelisolut puristavat supistellessaan maidon eteenpäin maitotiehyisiin. Kuva on muokattu kirjan Junqueira ja Carneiro (2003) ja artikkelin Cardiff ja Wellings (1999) kuvista.

Imetyksen aikana maitorakkuloissa muodostunut maito kulkeutuu maitotiehyiden kautta nänniin, ja sieltä vauvan suuhun. Aiemmin on ajateltu, että maitotiehyissä on nännipihan kohdalla erityisiä laajentumia, maitopoukamia, joissa on maitoa säilössä imetyskertojen välillä. Viimeisimmät tutkimukset kuitenkin osoittavat toisin. Ramsayn ym. (2005) ultraäänitutkimukset paljastivat, että maitotiehyet laajenevat tilapäisesti imetyksen yhteydessä, mutta palautuvat ennalleen sen jälkeen. Maitoa ei varastoida nännin lähellä olevissa isoissa tiehyissä, vaan se virtaa imetyksen loputtua takaisin ylöspäin pienempiin tiehyisiin. Anatomian kirjoissakin yleisesti kuvattuja maitopoukamia ei siis ole olemassa.

Ramsay ym. (2004, 2005) pystyi myös hyvin tarkasti määrittämään maitotiehyiden määrän ja rakenteen. Keskimäärin maitotiehyitä on yhdessä rinnassa 10, ja ne ovat noin 2 - 3 mm paksuja. Maitotiehyet haaroittuvat hyvin nopeasti, jo nännipihan alueella, noin 8 mm päässä nännistä.

2 Imetyksen fysiologia

Maidontuotanto käynnistyy kaksivaiheisesti. Alkuvaiheessa, joka tunnetaan myös nimellä laktogeneesi I, rinnan solut valmistautuvat maidon tuottamiseen muuttamalla morfologiaansa eli muotoa sekä metaboliaansa eli aineenvaihduntaa. Tuolloin maitorauhasissa muodostuvat ensimmäiset maitopisarat, joita kutsutaan ternimaidoksi tai kolostrumiksi. Toinen vaihe, laktogeneesi II, runsas maidontuotto, alkaa synnytyksen jälkeen.

2.1 Solujen erilaistuminen maidontuottoon (laktogeneesi I)

Laktogeneesin ensimmäisen vaiheen morfologiset ja metaboliset muutokset alkavat jo raskausaikana. Raskausajan hormonimuutokset, erityisesti korkeat veren estrogeeni- ja prolaktiinipitoisuudet saavat maitorauhasen tiehyiden ja rakkuloiden epiteelisolut jakautumaan vilkkaasti. Tämän seurauksena maitotiehyet haarautuvat lisää ja maitorakkuloiden määrä kasvaa (kuva I.3 A-C) (McManaman ja Neville, 2003).

Hormonien ohella monet kasvutekijät säätelevät raskausaikana maitorakkuloiden ja -tiehyiden lisääntymistä, epiteelisolujen jakautumista ja erilaistumista, sekä estävät apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa. Tällaisia ovat muun muassa epidermaaliset kasvutekijät (EGF), muuntavat kasvutekijät (TGF), insuliinin kaltaiset kasvutekijät (IGF) ja tuumorinekroositekijät (TNF α) (katsaus: Lamote ym. 2004).

Samaan aikaan morfologisten muutosten kanssa muuttuu myös maitorakkuloiden epiteelisolujen aineenvaihdunta. Maitoproteiinien ja maidontuotannossa tarvittavien entsyymien geenien ilmentyminen lisääntyy, ja soluihin kertyy rasvaa. Rasvapisaroita, joita epiteelisolut erittävät

imetysaikana maitoon, kertyy raskauden loppuvaiheessa niin paljon, että ne täyttävät solut lähes kokonaan (Neville ja Morton 2001).

Koska maitorakkuloiden epiteelisolut muuttuvat aktiivisesti erittäviksi, niiden solunsisäiset organellit muuttuvat. Soluihin kehittyy runsaasti energiatehtaina toimivia mitokondrioita, sekä tehokasta eritystä varten laaja karkea endoplasmakalvosto, hyvin toimiva Golgin laite ja eritysrakkuloita. Solut alkavat valmistaa maidon rasvoja sekä erittää niitä ainutlaatuisen, vain imetysaikana toimivan kuljetusreitit kautta. Myös muut eritysreitit kehittyvät. Muutosten ansiosta rinnasta tulee aktiivisesti erittävä rauhanen (McManaman ja Neville 2003).

Osa maitorakkulan soluista kykenee jo raskausaikana erittämään tiettyjä maidon komponentteja, mikä voidaan havaita muun muassa laktoosi- ja alfa-laktalbumiinipitoisuuksien kohoamisena veressä ja virtsassa. Eritysmekanismit ovat kuitenkin tällöin vielä epätäydellisiä (McManaman ja Neville 2003).

Veren korkea progesteronipitoisuus estää maidontuotannon ennen synnytystä. Loppuraskaudessa rinnassa kuitenkin muodostuvat jo ensimmäiset maitopisararat. Tämä "ensimaito", kolostrumi, ei kuitenkaan vielä vastaa koostumukseltaan tavallista äidinmaitoa. Se koostuu pääosin immunoglobuliineista ja muista veren proteiineista, jotka suojaavat vastasyntynyttä tartunnoilta (Neville ja Morton 2001).

2.2 Runsaan maidonerityksen käynnistyminen (laktogeneesi II)

Maidoneritys käynnistyy yleensä neljän päivän kuluessa synnytyksestä. Tuolloin tapahtuu suuria muutoksia äidin hormonituotannossa, maidon koostumuksessa ja määrässä, sekä maitorakkuloiden epiteelisoluissa.

2.2.1 Hormonaaliset muutokset

Progesteronipitoisuuden lasku synnytyksen yhteydessä käynnistää maidonerityksen. Progesteronia on runsaasti istukassa, joten maidoneritys käynnistyy vasta kun istukka on kokonaan poistunut. Pitoisuuden nopeaa putoamista kuvaa, että se on 48 tunnin jälkeen synnytyksestä noin 6 ng/ml, mutta 7 päivän jälkeen enää 0,7 ng/ml (Rasmussen ja Kjolhede 2004).

Maidonerityksen aloittamiseen ja sen ylläpitoon tarvitaan ainakin prolaktiinia ja kohtuullinen määrä glukokortikoideja (Nguyen ym. 2001). Muita maidontuotannon käynnistymiseen mahdollisesti vaikuttavia hormoneja ovat istukan laktogeeni sekä insuliini, mutta näiden vaikutusmekanismeja ei tunneta (Nguyen ym. 2001, Neville ja Morton 2001).

Prolaktiini, joka saa raskausaikana rinnat valmistautumaan imetykseen, on tärkein maidontuotannon ylläpito-hormoni. Sitä erittyy imetyksen yhteydessä äidin aivolisäkkeen

etulohkosta. Se edistää maitorakkuloiden toimintaa, tiiviiden liitosten sulkeutumista (2.2.4) ja maitoproteiinien ja laktoosin synteesiä (McManaman ja Neville 2003). Ylipainoisilla ja lihavilla naisilla imetyksen aiheuttama prolaktiinivaste on heikompi, mikä saattaa selittää näillä useammin esiintyvät ongelmat imetyksessä ja maidontuotannon viivästymisen (Rasmussen ja Kjolhede 2004).

Glukokortikoidien tiedetään prolaktiinin ohella olevan välttämättömiä maidoneritykselle. Niiden tarkkaa merkitystä ei tunneta, mutta niiden arvellaan olevan tärkeitä tiiviiden liitosten sulkeutumiselle imetyksen alussa. Korkeatkaan glukokortikoidien pitoisuudet eivät kuitenkaan yksinään edistä maidontuotantoa (Nguyen ym. 2001).

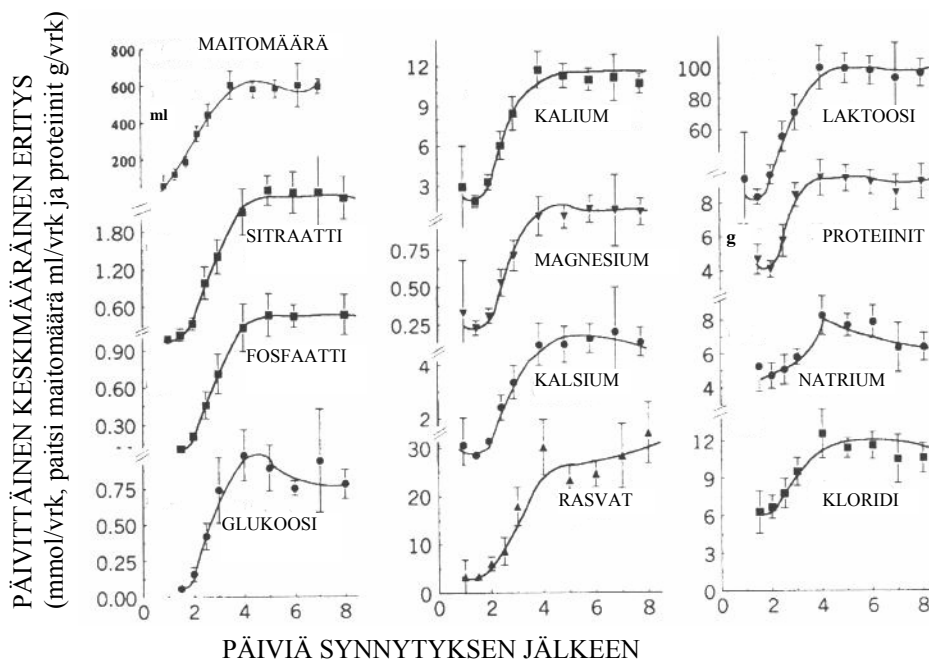
Oksitosiinihormoni on tarpeellinen maidon herumiselle. Sitä vapautuu äidin aivolisäkkeen takalohkosta, kun vauva imee tai nänniä stimuloidaan lypsämällä. Se supistaa maitorakkuloiden ja -tiehyiden myoepteelisoluja, ja käynnistää siten maidon herumisen. Supistus alkaa keskimäärin minuutin kuluttua imetyksen alkamisesta. Äiti kokee herumisen alkaessa usein nipistelyä, paineen tunnetta rinnassa ja janoa (Ramsay ym. 2004).

Oksitosiinia vapautuu imetyksen aikana pulsseina vereen noin minuutin välein. Ramsayn ym. (2004) tutkimuksen mukaan useimmilla heruminen käynnistyy imetyksen aikana moneen kertaan, vaikka äiti ei sitä tunnekaan. Imetyskerralla nautittu maitomäärä on tällöin keskimääräistä suurempi. Tämä ei kuitenkaan vaikuta vauvan nauttimaan päivittäiseen maitomäärään.

2.2.2 Maidon koostumuksen ja määrän muutokset imetyksen alkuvaiheessa

Imetyksen alussa maidon koostumus muuttuu muutamassa päivässä kolostrumista valmiiksi maidoksi (kuva I.4). Valmis maito sisältää paljon enemmän laktoosia ja kaliumia, mutta vähemmän immunoglobuliinia, natriumia, kloridia ja seerumin proteiineja kuin kolostrumi. Suurin osa muutoksista tapahtuu 72 tunnin kuluessa synnytyksestä (Neville ym. 1991).

Laktoosin määrä nousee välittömästi syntymän jälkeen ja lopullinen valmiin maidon pitoisuus saavutetaan 72 tunnin jälkeen synnytyksestä (kuva I.4). Erittävän immunoglobuliini A:n ja laktoferriinin pitoisuudet kasvavat merkittävästi synnytyksen jälkeen ja pysyvät korkealla ensimmäiset 48 tuntia, minkä jälkeen ne laskevat nopeasti. Näiden proteiinien määrä on kuitenkin koko imetysajan merkittävä, noin 2 - 3 grammaa päivässä (eli 800 ml:ssa äidinmaitoa) kumpaakin. Myös oligosakkaridipitoisuudet ovat korkeat imetyksen alkuvaiheessa, jopa yli 20 g/l neljän päivän kuluttua synnytyksestä. Pitoisuus laskee kuitenkin kuukaudessa arviolta 14 grammaan litrassa (Neville & Morton, 2001). Näiden yhdisteiden korkea määrä juuri imetyksen alkuvaiheessa on mielekästä, sillä immunoglobuliinit, laktoferriini ja oligosakkaridit suojelevat vastasyntyntä bakteri- ja virustartunnoilta (Newburg ym. 2005, May 1984).



Kuva I.4 Muutokset maidon tilavuudessa ja eri ravinteiden määrissä imetyksen alkuvaiheessa, ensimmäisten 8 vuorokauden aikana. Muokattu artikkelin Neville ym. (1991) kuvasta.

Maidon määrä muuttuu jyrkästi imetyksen alkuvaiheessa varsinaisen maidontuotannon alettua. Ensimmäisenä päivänä synnytyksestä maidon määrä on alle 100 ml, mutta se nousee arviolta 500 millilitraan neljässä päivässä. Ensimmäisen kuukauden kuluessa määrä tasaantuu tyypilliseksi imevän vauvan noin 800 millilitran päiväannokseksi (Kent ym. 2006).

2.2.3 Maitorakkulan epiteelisolujen erityisreitit

Maitorakkuloiden epiteelisolut tuottavat yhdisteitä maitoon viittä eri erityisreittiä pitkin, mutta niistä parasellulaarinen (kappale 2.2.4) on suljettuna imetyksen aikana (katsaus aiheeseen: McManaman ja Neville 2003).

Epiteelisolut erittävät pääosan maidon vesiliukoisista yhdisteistä, kuten keskeiset maitoproteiinit, veden, laktoosin, olikosakkaridit, fosfaatin, kalsiumin ja sitraatin eksosytoosilla (kuva I.5, reitti I). Eksosytoosieritys tapahtuu samalla tavoin kuin muissakin soluissa eli yhdisteet pakataan Golgin laitteessa eritysrakkuloihin ja kuljetetaan solukalvolle, josta ne kuroutuvat irti.

Epiteelisoluilla on ainutlaatuinen kuljetusreitti maitorasvoille (kuva I.5, reitti II). Rasvat valmistetaan sileällä endoplasmakalvostolla ja pakataan välittömästi pieneen proteiinikalvoon. Näin muodostuneet maitorasvapisarot kuljetetaan solukalvolle, jossa ne erittyvät silmikoitumalla solukalvosta.

Epiteelisolut kuljettavat, paitsi edellä kuvattuja itse valmistamiaan yhdisteitä, myös monia aineita solujen ulkopuolelta verestä ja soluvälitilasta. Proteiinit ja muut makromolekyylit voidaan kuljettaa solun läpi (transsytoosi) nielaisemalla ne ensin sisään rakkulassa (endosytoosi) ja sylkäisemällä sitten jälleen ulos (eksosytoosi) (kuva I.5, reitti III). Epiteelisolujen läpi kulkevat tällä tavoin, ja mahdollisesti myös jollain vielä tuntemattomalla mekanismilla, veren proteiinit, kuten immunoglobuliinit, albumiini ja transferriini, hormonit, kuten insuliini, prolaktiini ja estrogeeni, sekä soluvälitilan yhdisteet, kuten immunoglobuliini A, sytokiinit ja lipoproteiini lipaasi (McManaman ja Neville 2003).

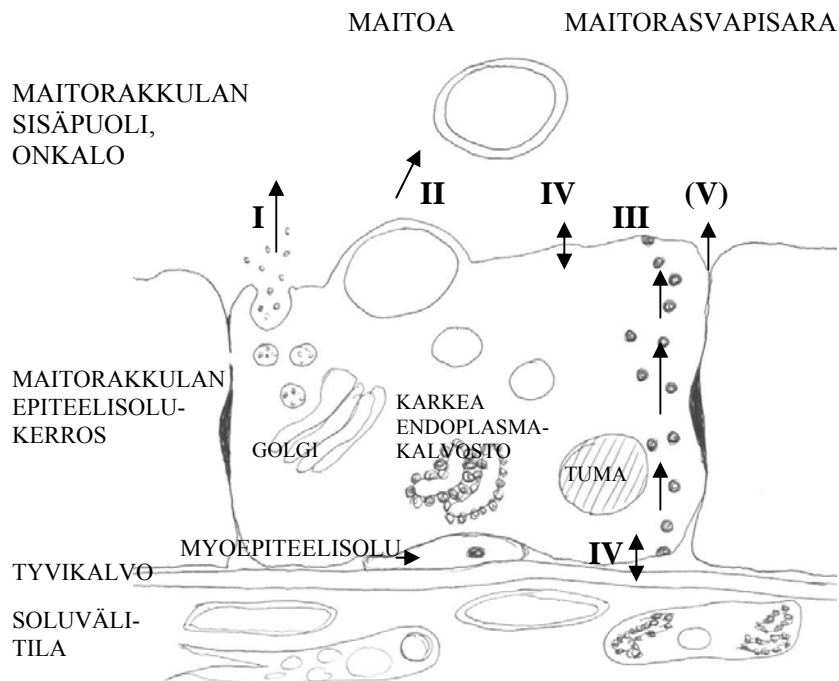
Solukalvon erilaiset kuljetuskanavat (kuva I.5, reitti IV) vievät pieniä molekyyliä ja ioneja solun läpi. Ioneille, kuten natriumille, kaliumille ja kloridille, on omat kuljetuskanavansa solukalvossa. Glukoosille ja aminohapoille on niin ikään löydetty erityiset kuljetusreitit solukalvosta (McManaman ja Neville 2003).

2.2.4 Tiiviiden liitosten sulkeutuminen

Suuret muutokset maidon koostumuksessa imetyksen alkuvaiheessa (kappale 2.2.2) heijastavat maidon määrän kasvua, mutta selittyvät osittain maitorakkuloiden epiteelisolujen välisten tiiviiden liitosten sulkeutumisella. Tiiviit liitokset, jotka koostuvat soluvälitilan tukkivista tiivisliitosproteiineista, estävät niin sanotun parasellulaarisen reitin eli yhdisteiden vuotamisen epiteelisolujen välistä maitoon (kuva I.5, V).

Raskausaikana parasellulaarinen reitti on vielä auki. Siksi kolostrumissa on erityisen paljon verestä tulleita proteiineja ja valkosoluja. Reitin sulkeutumisen jälkeen maitoon pääsee yhdisteitä ainoastaan epiteelisolujen kautta, eli transsellulaarisesti.

Tiiviit liitokset rakoilevat vieroituksen ja rintatulehduksen aikana. Tulehduksen aikana liitosten välistä pääsee valkosoluja ja muita veren yhdisteitä maitoon. Tämä läpäisevyyden lisääntyminen on luultavasti syynä siihen, että esimerkiksi HIV tarttuu normaalia helpommin juuri rintatulehduksen aikana äidistä vauvaan (katsaus aiheeseen: Dorosko 2005).



Kuva I.5 Maidoneritys maitorakkulan epiteelisoluista. Epiteelisolut erittävät maitorakkulaan maidon komponentteja useita reittejä pitkin (I - V). Reitti I kuvaa maidon proteiinien, laktoosin, kalsiumin ja muiden vesiliukoisten yhdisteiden erittymistä eksosytoosissa. Reitti II kuvaa maitorasvan erittymistä solukalvoon sitoutuneina rasvapisaroina. Reitti III havainnollistaa soluvälitilan ja seerumin yhdisteiden, kuten immunoglobuliinien, albumiinin, transferrinin, insuliinin, prolaktiinin ja estrogeenin, kuljetusta solujen sisällä kulkevissa rakkuloissa. Reitti IV puolestaan näyttää nuolilla ionien ja pienten molekyylien, kuten veden, glukoosin ja aminohappojen, suoran siirtymisen solukalvon läpi erilaisten kuljetuskanavien kautta. Reitti V osoittaa parasellulaarista reittiä, joka on avoin kulkuväylä epiteelisolujen välillä. Se on kuitenkin kuvassa suljettu, sillä se on avoinna vain raskauden, vieroituksen ja rintatulehduksen aikana. Sen kautta pääsevät soluvälitilan ja seerumin yhdisteet sekä valkosolut kulkeutumaan suoraan maitoon. Muokattu artikkelin McManaman & Neville (2003) kuvasta. Maitorakkulan rakenne on esitetty tarkemmin kuvassa I.3.

3 Maidon koostumus ja määrä

Rintamaito on parasta ravintoa vastasyntyneelle, eli kuten sanotaan ”breast is best”. Äidinmaito on koostumukseltaan ainutlaatuista, sillä se on kehittynyt juuri ihmislapsen kasvua varten. Se poikkeaa selvästi koostumukseltaan muiden nisäkkäiden maidosta (taulukko I.1).

Ravinteiden lisäksi äidinmaidossa on runsaasti vasta-aineita ja antimikrobisia yhdisteitä, proteiineja, oligosakkarideja ja lipidejä, jotka estävät taudinaiheuttajia (kappale 3.2). Toisaalta siinä on myös hyödyllisen suolistobakteeriston, kuten bifidobakteerien, kasvua tukevia yhdisteitä. Rintamaito siis aktiivisesti suosii "hyviä" bakteereita ja tappaa "pahoja". Lisäksi äidinmaidossa vauva saa ainoan annoksen normaalibakteereita, joilla on luultavasti merkitystä taudinaiheuttajien ehkäisyssä (kappale 4, tämä tutkimus). Voidaan siis hyvällä syyllä puhua maailman vanhimmasta funktionaalisesta elintarvikkeesta.

Taulukko I.1 Tiettyjen yhdisteiden keskimääräiset pitoisuudet eri nisäkäslajien maidoissa (Mepham 1987).

Laji	Laktoosi (mM)	Rasva (g/l)	Kaseiini (g/l)	Heraproteiinit (g/l)	Kalsium (mM)
ihminen	192	38	4	6	7
lehmä	133	37	28	6	30
vuohi	114	45	25	4	22
lammas	133	74	46	9	58
sika	153	68	28	20	104
hevonen	172	19	13	12	17
rotta	90	103	64	20	80
marsu	83	39	66	15	41
kani	60	183	104	32	214

Äidinmaito imeytyy erittäin tehokkaasti vauvan suolistossa. Monet mineraalit, kuten rauta, imeytyvät huomattavasti paremmin rintamaidosta kuin äidinmaidonkorvikkeista. Siksi niitä lisätään korvikkeisiin suurempia pitoisuuksia (taulukko I.2). Kun korvikkeen syömisen jälkeen vauvan suolisto tyhjenee 3-4 tunnissa, imetyksen jälkeen tyhjentyminen on puolet nopeampaa (Newton 2004).

Taulukko I.2 Esimerkki äidinmaidon, lehmänmaidon ja korvikkeen peruskoostumuksista desilitraa kohti (Newton 2004, NAN1-äidinmaidonkorvikepakkaus).

	Äidinmaito	Lehmänmaito	*NAN1-korvike
energiaa (kcal/dl)	65	65	67
proteiineja (g/dl)	0,9	3,7	1,2
rasvaa (g/dl)	3,8	3,7	3,5
laktoosia (g/dl)	6,8	4,8	7,5
muita oligosakkarideja	1,3	-	-
mineraaleja (mg/dl)	200	700	185
heraproteiini:kaseiini-suhde	60:40	20:80	

* Korvikepakkauksessa ilmoitettujen pitoisuuksien mukaan (NAN äidinmaidonkorvike, Nestle)

Imetyksen alkuvaiheessa maidon koostumus muuttuu rajusti ensimmäisen kuukauden aikana (kappale 2.2.2), mutta säilyy tämän jälkeen samanlaisena mikäli imetystä jatketaan vuoden ikäiseksi, tai jopa 2-3-vuotiaaksi (Boediman ym. 1979). Yli vuoden imettäneillä äidinmaidon rasvapitoisuus ja sitä kautta saatava energiamäärä tosin kasvaa merkittävästi (Mandel ym. 2005).

Äidinmaidon koostumus riippuu myös yksilöllisistä tekijöistä. Esimerkiksi maidon rasvapitoisuuden ja rasvahappokoostumuksen sekä rasvaliukoisten vitamiinien määrän on havaittu riippuvan äidin ravitsemuksesta (Rocquelin ym. 1998a ja 1998b, Olafsdottir ym. 2001).

Keskimäärin vauva nauttii äidinmaitoa vuorokaudessa noin 800 millilitraa. Kentin ym. (2006) tutkimuksessa imetystahti 1 - 6 kk ikäisillä vauvoilla (n = 71) oli keskimäärin 11 kertaa vuorokaudessa, imetysväli hieman yli 2 tuntia ja maitomäärä kullakin rintaruokinnalla noin 70 grammaa. Suurin osa vauvoista (64 %) söi myös muutaman kerran yöllä.

Kentin ym. (2006) tutkimuksessa maidonkulutus kuukauden ikäisillä vauvoilla oli lähes samansuuruinen kuin puolivuotiailla. Pienet vauvat (1 - 3 kk) kasvavat nopeammin kuin isommat (4 - 6 kk) ja tarvitsevat energiaa aineenvaihduntaan suhteessa enemmän. Pienillä vauvoilla ravintoa kuluu myös suhteellisesti huomattavasti enemmän ruumiinlämmön ylläpitämiseen (Kent ym. 2006).

Vauvan päivittäin nauttimaan maitomäärään vaikuttaa lähinnä vauvan kasvunopeus. Yleisesti poikavauvat syövät suurempia kerta-annoksia ja kasvavat nopeammin kuin tyttövauvat. Suurimman maitomäärän yhdellä imetyskerralla vauva nauttii öisin tai aamuisin. Vuorokauden kokonaismaitomäärä ei kuitenkaan riipu siitä, syökö yöllä vai ei. Syömistavat riippuvat lähinnä vauvan mieltymyksistä ja ruoansulatuksesta. Jotkut vauvat syövät säännöllisesti pieniä annoksia pitkin päivää, toiset epäsäännöllisiä isoja annoksia (Kent ym. 2006). Imetyksen alkuvaiheessa tiheiden imetysvälien merkitys on myös suojella vastasyntyntä uhkaavalta hypotermialta eli alilämpöisyydeltä (Huffman ym. 2001).

Toisin kuin on aiemmin ajateltu, vauva ei imetyksessä tyhjennä rintoja, vaan nauttii keskimäärin vain kaksi kolmasosaa rinnassa kulloinkin tarjolla olevasta maitomäärästä. Kentin ym. (2006) mukaan ei ole väliä mitä rintaa tarjotaan ensin tai syötetäänkö yhdellä imetyskerralla kummastakin rinnasta vai vain toisesta. Vauva itse päättää, miten paljon maitoa nauttii. Oikea rinta on useimmilla naisilla (76 %) selvästi tuotteliaampi kuin vasen (Kent ym. 2006).

3.1 Ravinteet

Äidinmaidon pääkomponentti on vesi. Kuiva-aineista eniten on laktoosia ja lipidejä. Ne toimivat vauvan pääasiallisina energianlähteinä. Monimutkaisia oligosakkarideja, jotka ovat kolmanneksi yleisin komponentti, äidinmaidossa on muihin maitoihin verrattuna erityisen paljon.

Terve vastasyntynyt saa äidinmaidosta kaikki tarvitsemansa kivennäiset ja vitamiinit, mutta Suomessa on talvella vähäisen auringonvalon vuoksi D-vitamiinilisä tarpeen. Lisäksi K-vitamiinipistos annetaan verenvuototaudin estämiseksi Suomen synnytyssairaaloissa kaikille vastasyntyneille.

Toisin kuin täysiaikaisina syntyneille, keskosvauvoille ravinne- ja vitamiinilisät ovat äidinmaidon ohella usein tarpeellisia, sillä elimistöön sikiöaikana muodostuneet varastot ovat pienemmät ja ravinteiden tarve suurempi (Ford ym. 1983).

3.1.1 Laktoosi

Äidinmaidossa on erittäin paljon laktoosia, noin 7 g/dl (taulukko I.2). Se on maidon pääasiallinen kuiva-aine.

Maitorakkuloiden epiteelisolujen laktoosisyntetaasi, joka koostuu β -1,4-galaktosyyli transferaasista ja α -laktalbumiinista, valmistaa laktoosin galaktoosista ja glukoosista (Ramakrishnan ja Qasba 2001). Maidossa on vain jäänteitä vapaasta glukoosista (14 mg/dl) ja galaktoosista (12 mg/dl) (Newton 2004).

Vastasyntynyt tarvitsee paljon laktoosia kasvuun sekä aivojen ja keskushermoston kehittymiseen. Laktoosi on, rasvojen ohella, pääasiallinen vastasyntyneen energianlähde. Sen määrä eri nisäkkäiden maidossa heijastaa kyseisen lajin aivojen kokoa (taulukko I.1). Ihmisellä on suhteessa laajat aivot ja myös laktoosia on enemmän kuin muiden lajien maidoissa (Newton 2004).

Laktoosin toinen tärkeä tehtävä on sitoa vesimolekyylejä, jotka erittyvät maitoon. Äidinmaito riittää ainoaksi juomaksi terveelle vauvalle jopa kuumissa ilmasto-olosuhteissa (Almroth 1978).

Laktoosi hajoitetaan vauvan suolistossa laktaasi-entsyymien avulla jälleen monosakkarideiksi. Imeytyminen suoliston seinämän läpi on kuitenkin hidasta, joten sokerit ovat pitkään suolistomikrobien käytössä. Mikrobit tuottavat fermentoidessaan maitohappoa, joka laskee suoliston pH:n. Happamuus estää monien haitallisten bakteerien kasvua ja ylläpitää suoliston asidofiilistä mikrobistoa (Mepham 1987). Lisäksi laktoosi auttaa magnesiumin ja kalsiumin imeytymistä suolistossa, mikä on tärkeää, sillä kyseisten mineraalien pitoisuudet ovat ihmismaidossa muihin lajeihin verrattuna matalat (Darby ja Loughhead 1996).

3.1.2 Lipidit

Lipidit muodostavat määrältään äidinmaidon toiseksi suurimman kuiva-aineen (~ 4 g/dl). Suurin osa, noin 98 % lipideistä on triglyseridejä, noin 0,7 % on fosfolipidejä ja 0,5 % kolesterolia. Palmitiinihappo (C16:0), oleiinihappo eli öljyhappo (C18:1) ja linoleenihappo (18:2) muodostavat noin 60 % äidinmaidon rasvahapoista. Lehmänmaidossa ja äidinmaidonkorvikkeissa on vähemmän

näitä rasvahappoja, mutta enemmän lyhytketjuisia rasvahappoja, kuten C10:0, C12:0 ja C14:0 (Newton 2004).

Lipidit ovat tärkeä energianlähde. Niistä muodostuu yli 50 % vauvan saamista kaloreista. Lipidien hajoamistuotteena suolistossa syntyneet rasvahapot ja monoglyseridit estävät virusinfektioita ja parasiitteja, kuten *Giardia lamblia*. Ne myös muodostavat fosfolipidien ja kolesterolin kanssa keskeiset kudosten ja keskushermoston kasvulle tarvittavat yhdisteet. Linoli- ja linoleenihapot ovat välttämättömiä kasvulle ja muiden rasvahappojen, kuten pitkäketjuisten monityydyttymättömien rasvahappojen (LCPUFA), valmistamiselle. Pääosa (70%) äidinmaidon linoli- ja linoleenihapoista tulee äidin rasvakudoksesta (Newton 2004).

Äidinmaidossa on paljon pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja, erityisesti terveellistä omega-3 rasvahappoa, dokosaheksaenihappoa (C22:6). Nämä rasvahapot ovat tärkeitä hermokudoksen muodostumiselle ja toiminnalle. Esimerkiksi arakidonihappo (C20:4, omega-6) ja dokosaheksaenihappo (C22:6) ovat tyypillisiä aivojen harmaalle aineelle ja C20:1 sekä C24:1 hermosoluja suojavalle myeliinille. Näiden välttämättömien rasvahappojen tarve on vastasyntyneellä valtava. Ensimmäisen elinvuoden aikana aivojen koko lähes kolminkertaistuu. Eniten, 85 %, kasvavat isot aivot, joiden kudoksesta 60 % muodostuu lipideistä (Newton 2004).

Lipidit ovat äidinmaidossa 1–10 µm:n kokoisina pisaroina, joista suurin osa on noin 1 µm:n kokoisia. Koska pisaroiden kokonaispinta-ala on niiden pienen koon vuoksi suuri (4,5 m²/dl), äidinmaidon ja suoliston lipaasit pystyvät sitoutumaan ja hajottamaan ne helposti, jolloin imeytyminen on tehokasta (Newton 2004).

Äidinmaidon rasvapitoisuus muuttuu imetyksen aikana. Imetyksen alussa vauvan nauttima ns. etumaito on vähärasvaisempaa kuin loppuvaiheen ns. takamaito, sillä maidon rasvapitoisuus on sitä suurempi, mitä tyhjempi rinta on. Imetystiheydellä tai sillä, miten tyhjäksi vauva rinnan imee, ei kuitenkaan ole merkitystä vauvan päivittäin saamaan rasvamäärään. Mikäli rinta jää puolityhjäksi edelliseltä imetyskerralta, etumaidossa on vastaavasti seuraavalla kerralla enemmän rasvaa (Kent ym. 2006).

3.1.3 Oligosakkaridit

Oligosakkaridit ovat määrällisesti kolmanneksi suurin ravinneyhdiste rintamaidossa. Niitä on löydetty rakenteeltaan yli 100 erilaista (katsaus: Kunz ym. 2000). Arviot määristä vaihtelevat 5–8 g/l (Kunz ym. 2000) ja 12–14 g/l (Urashima ym. 2001) välillä. Kolostrumissa niitä on vielä enemmän, arviolta 21–24 g/l (Urashima ym. 2001).

Äidinmaidon oligosakkaridien on todettu estävän suolistotulehduksia aiheuttavia bakteereita (katsaus: Newburg ym. 2005) ja toimivan prebiootteina eli edistävän hyödyllisten

suolistobakteerien kasvua (Coppa ym. 2004). Tarkkaa prebioottista vaikutusmekanismia ei tunneta, mutta näyttäisi siltä, että osa suoliston mikrobeista, kuten *Bifidobacterium infantis*, pystyy käyttämään oligosakkarideja ravintonaan (Ward ym. 2006). Koska oligosakkarideja on äidinmaidossa runsaasti, vaikutus bakteerikoostumukseen on luultavasti merkittävä. Oligosakkariden ajatellaan myös olevan tärkeitä aivojen kehittymiselle (katsaus: Kunz ym. 2000).

Äidinmaidon oligosakkaridien erikoispiirre on, että ne eivät hajoa vastasyntyneen suolen seinän erittämällä entsyymeillä, kuten laktaasilla. Ne kulkeutuvat siten vauvan ohutsuolesta imeytymättä paksusuoleen, jossa bakteerit käyttävät niitä ravintonaan (Coppa ym. 2004, Ward ym. 2006).

Lisäksi oligosakkarideja poistuu, varsinkin imetyksen alkuvaiheessa, ulosteen mukana, sekä hieman myös virtsan kautta (Kunz ym. 2000).

Kunzin ym. (2000) mukaan on mahdollista, että oligosakkaridit kiertävät vauvan verenkierrassa jonkin aikaa ennen erittymistään virtsaan. Siten niillä voi olla hyödyllisiä vaikutuksia muun muassa vauvan puolustusjärjestelmän toimintaan.

Oligosakkaridit valmistetaan maitorauhasessa glykosyylitransferaasientsyymien avulla. Entsyymit lisäävät asteittain monosakkarideja (galaktoosi, fukoosi, N-asetyyli-glukosamiini, siaalihappo) laktoosiin, jolloin muodostuu monimutkaisia oligosakkarideja (Coppa ym. 2004).

Pitkään ajateltiin, että ihmismaidossa esiintyy ainutlaatuisen paljon monimutkaisia oligosakkarideja, sillä muun muassa lehmänmaidossa oligosakkarideja on vain hyvin pieniä määriä (taulukko I.2). Hiljattain on kuitenkin löydetty korkeita oligosakkaridipitoisuuksia myös muiden nisäkkäiden, kuten norsujen, pussieläinten ja karhujen maidoista (katsaus aiheeseen: Urashima ym. 2001). On päätelty, että äidinmaidon oligosakkaridit ovat tärkeitä aivojen kehittymiselle. Niitä esiintyy äidinmaidossa erityisesti hitaasti kasvavilla eläimillä, joilla on laaja, pääosin vasta syntymän jälkeen kehittyvä keskushermosto (Kunz ym. 2000).

Lakto-N-tetraoosi (LNT) on äidinmaidossa määrällisesti runsain oligosakkaridi (0.5–1.5 g/l), joka johdannaisineen muodostaa ~50–70 % rintamaidon kaikista oligosakkarideista. Toiseksi yleisimpiä ovat lakto-N-fukopentaoosit. Sialyloiduista oligosakkarideista yleisimpiä ovat NeuAc α 2-6Lac ja NeuAc α 2-3Lac, joita on yhteensä noin 1 g/l. Monia oligosakkarideja on siis äidinmaidossa suhteellisen suuria pitoisuuksia, usein vastaavia määriä kuin esimerkiksi laktoferriiniä, alfa-laktalbumiinia ja erittyvää IgA:ta (Kunz ym. 2000).

3.1.4 Proteiinit

Äidinmaidon kokonaisproteiinipitoisuus on keskimäärin noin 9 g/l, mutta se vaihtelee imetyksen eri vaiheissa. Alkuvaiheessa pitoisuus on noin 14–16 g/l, 3–4 kuukauden iässä noin 8–10 g/l ja puolivuotiaana ja sitä myöhemmin noin 7–8 g/l. Suurimman osan proteiineista tuottavat

maitorakkulan epiteelisolut, mutta muutamia poikkeuksia on, kuten verenkierrasta epiteelin läpi erittyvä albumiini (katsaus: Lönnerdal 2003).

Monet proteiineista imeytyvät ohutsuolessa ja toimivat siten hyvin tasapainotettuna aminohappolähteenä nopeasti kasvavalle vauvalle. Osa proteiineista auttaa muiden ravinteiden imeytymistä ja hyödyntämistä. Useilla, kuten lysotsyymillä ja laktoferriinillä, on antimikrobista aktiivisuutta. Ne suojelevat imeväisikäistä tautia-aiheuttavilta mikrobeilta. Osa toimii myös prebioottisesti edistämällä suoliston bifidobakteerien ja laktobasillien kasvua. Jotkut kykenevät muokkaamaan vastasyntyneen puolustusjärjestelmää suoliston pinnalla ja muissa elimissä (Lönnerdal 2003).

Maidon proteiinit voidaan luokitella kolmeen ryhmään: heraproteiineihin, kaseiineihin ja musiineihin. Heraproteiinit ja kaseiinit ovat äidinmaidon pääproteiineja. Musiinit, jotka muodostavat kalvon rasvan ympärille maitorasvapisaroissa, edustavat vain pientä osaa kokonaisproteiineista (Lönnerdal 2003).

Kaseiinien ja heraproteiinien määrät muuttuvat nopeasti imetyksen alkuvaiheessa. Ensimmäisinä päivinä heraproteiineja on paljon ja kaseiinia hyvin vähän, jos ollenkaan. Myöhemmin kaseiinien määrä kasvaa ja heraproteiinien vähenee, osittain johtuen maidon määrän voimakkaasta kasvusta (Lönnerdal 2003). Keskimäärin valmiissa maidossa on noin 60–70 % heraproteiineja ja 30–40 % kaseiineja (Newton 2004).

Ihmismaidon kaseiini sisältää esterisidoksellisia fosfaattiryhmiä ja sillä on korkea proliinipitoisuus. Se muodostaa, toisin kuin lehmänmaidon kaseiini, vauvan vatsassa pieniä, pehmeitä kertymiä, jotka imeytyvät helposti ja joissa kalsium on helposti imeytyvässä muodossa (Newton 2004).

Äidinmaidon aminohappokoostumus on erilainen kuin lehmänmaidon, johtuen erilaisista kaseiinien ja heraproteiinien koostumuksista. Yleisesti, metioniinin ja kysteiinin suhde äidinmaidossa on 1:1, kun se lehmänmaidossa on 2–3:1. Rintamaidossa on myös korkea pitoisuus tauriinia, joka on tärkeää aivojen ja verkkokalvon toiminnalle. Tauriinia lisätäänkin siksi myös korvikemaitoihin (Newton 2004).

Äidinmaidossa on yli 20 aktiivista entsyymiä, jotka auttavat maitorauhasen toiminnassa (laktoosisyntetaasi), ravinteiden imeytymisessä (amylaasi, lipaasit, proteaasit), tulehdusten estämisessä (lysotsyymi, peroksidaasi, laktoferriini), raudan imeytymisessä (latoferriini) ja edistävät vauvan kasvua (alkaalinen fosfataasi, ksantiinioksidaasi). Alfa-laktalbumiinia, laktoferriiniä ja lysotsyymiä on äidinmaidossa paljon enemmän kuin lehmänmaidossa (Newton 2004).

3.1.5 Kivennäisaineet

Äidinmaidon kivennäisainekoostumus ei ole vakio, vaan se riippuu vauvan iästä ja imetysvaiheesta. Joidenkin mineraalien määrään vaikuttaa myös äidin ruokavalio (Karra ym. 1988). Tämän vuoksi niiden arviointi on vaikeaa. Kokonaisuudessaan äidinmaidossa on noin 0,15–0,28 painoprosenttia mineraaleja (Dorea 2000b).

Päivittäin vauva saa äidinmaidosta keskimäärin noin 280 mg kalsiumia ja 120 mg fosforia (Newton 2004). Kyseiset kivennäisaineet ovat välttämättömiä luiden ja hampaiden kehittymiselle. Kalsiumia tarvitaan myös veren hyytymiseen, hermosolujen viestinvälitykseen ja lihassupistuksiin. Fosforia tarvitaan luiden lisäksi B-vitamiinien imeytymiseen, energiantuotantoon (ATP), solujen rakenteisiin (fosfolipidit, DNA, RNA) ja moniin entsyymeihin.

Kaliumia ja natriumia vauva saa äidinmaidosta päivittäin noin 460 mg ja 120 mg (taulukko I.3). Niiden avulla elimistö säätelee verenpainetta ja estää ylimääräisen nesteen kertymisen elimistöön. Kalium on lisäksi välttämätön solujen ja hermokudoksen toiminnalle, ja se aktivoi useita entsyymejä sekä auttaa hermoimpulssien välityksessä.

Muita elimistölle tärkeitä, mutta määrältään vähäisempiä, äidinmaidon kivennäisaineita ovat magnesium, kupari, rauta ja sinkki. Magnesiumia on äidinmaidossa keskimäärin 30 mg/l (Dorea 2000c) eli päivittäinen vauvan annos (800 ml äidinmaitoa) on noin 25 mg. Magnesium on välttämätön solujen korjaamismekanismeille, hormoneille, hermojen ja lihasten toiminnalle sekä säännölliselle sydämen toiminnalle. Se aktivoi entsyymejä käyttämään veren sokereita, proteiineja ja hiilihydraatteja ja on välttämätön luiden kasvulle ja epäsuorasti riittävälle kalsiumin imeytymiselle.

Taulukko I.3 Tiettyjen kivennäisaineiden keskimääräinen pitoisuus erilaisissa maidoissa 800 ml:aa kohti (keskimääräinen vauvan päivittäin nauttima maitomäärä) (Newton 2004):

Kivennäisaine	Äidinmaito	Lehmänmaito	Korvike	*RDA
kalsium (mg)	280	1040	368	400
fosfori (mg)	120	960	272	300
natrium (mg)	120	464	168	250
kalium (mg)	456	1160	568	637
sinkki (mg)	1,2	-	4,0	5
kupari (ug)	320	112	472	400
rauta (mg)	0,8	0,56	1,08	6

*RDA = Yhdysvaltain ravitsemusneuvoston antama päivittäinen saantisuositus.

Sinkkiä vauva saa päivittäin äidinmaidosta noin 1,2 mg. Se tukee immuunijärjestelmän toimintaa, normaalia proteiinisynteesiä ja on tärkeää sukupuolielinten terveydelle.

Rautaa vauva saa äidinmaidon kautta päivittäin noin 0,8 mg (Newton 2004). Sillä on tärkeä tehtävä hemoglobiinin biosynteesissä. Se toimii happea kantavana osana. Sitä tarvitaan myös solun energiantuotannossa, hermovälittäjäaineiden serotoniinin ja dopamiinin valmistuksessa, kollageenin muodostuksessa ja puolustusjärjestelmän toiminnassa.

Kuparia vauva saa äidinmaidosta päivittäin noin 320 µg. Se auttaa estämään sydän- ja verisuonisairauksia sekä aivohalvauksia ja on hyväksi luille ja immuunijärjestelmälle. Se toimii raudan tavoin myös useiden entsyymien tärkeänä kofaktorina.

Äidin ruokavalio näyttäisi vaikuttavan eräiden kivennäisaineiden, kuten sinkin määrään. Kalsiumin ja magnesiumin määrät äidinmaidossa eivät kuitenkaan muutu, vaikka äiti söisi niitä normaalia enemmän (Karra ym. 1988).

Vaikka kivennäisaineita on äidinmaidossa usein vähemmän kuin suositellaan ohjearvoissa vastasyntyneelle kasvun ja kehityksen turvaamiseksi (taulukko I.3), ei äidinmaidon ole todettu aiheuttavan puutoksia niiden määrissä. Vastasyntyneellä on nimittäin kivennäisainevarastoja, jotka ovat kertyneet sikiöaikana, erityisesti raskauden viimeisellä kolmanneksella. Näitä varastojaan, kuten rauta- ja kuparivarastoja, vastasyntynyt käyttää tehokkaasti hyväkseen. Lisäksi äidinmaidossa kivennäisaineet ovat helposti hyödynnettävässä muodossa, joten puutostiloja ei rintaruokituille yleensä synny (Dorea 2000b).

3.1.6 Vitamiinit

Äidinmaito sisältää yleisesti terveen täysiaikaisena syntyneen vauvan kasvuun tarvittavat ravinteet ja vitamiinit (taulukot I.4 ja I.5), ainoastaan D- ja K-vitamiineja suositellaan annettavaksi rintamaidon lisäksi.

Keho tuottaa D-vitamiinia auringon ultraviolettia B-säteilyn vaikutuksesta. Äidinmaidossa sitä on vain suhteellisen pieni määrä (taulukko I.4, Lammi-Keefe ja Jensen 1984). Se on tärkeä vitamiini luille ja hampaille, sillä se edistää kalsiumin imeytymistä. Koska Suomessa, kuten muissakin pohjoismaissa, auringonvaloa on talviaikaan vain vähän, D-vitamiinia pitää lisätä ruokavalioon. Sosiaali- ja terveysministeriö suosittelee, että 0–3-vuotiaille annetaan D-vitamiinilisää 5–10 µg päivittäin, riippuen muusta ravitsemuksesta. Nykyisin Suomessa lisätään myös maitojuomiin 0,5 µg/dl D-vitamiinia. Aiemmin D-vitamiinipuutteen aiheuttama riisitauti oli yleinen lapsuusiän tauti, etenkin talviaikaan.

Äidinmaidon K-vitamiinipitoisuutta pidetään liian pienenä vastasyntyneelle (Canfield ym. 1991). K-vitamiini on tärkeää veren hyytymiselle. Sen puute aiheuttaa verenvuototaudin, jota esiintyy

yhdeällä lapsella 200–400:sta vastasyntyneestä, jos näille ei anneta K-vitamiinilisää. Suomessa vastasyntyneet saavat rutiinisti 1 mg:n K-vitamiinipistoksen synnytyssairaalassa (Sosiaali- ja terveysministeriön suositus).

Taulukko I.4 Rasvaliukoisten vitamiinien määrien vertailu erilaisissa maidonlähteissä (Newton 2004). Vitamiinipitoisuus mikrogrammoina 800 millilitraa kohti:

Vitamiini	Äidinmaito	Lehmänmaito	Korvike	RDA
A (µg RE)	535	328	320	395
Betakaroteeni (µg)	138	?	?	?
D (µg)	0.45	0.16	8	7.5
E (µg)	2.0	0.56	7.5	3
K (µg)	12	48	43	5

RDA = Yhdysvaltain ravitsemusneuvoston antama päivittäinen saantisuositus.

Taulukko I.5 Vesiliukoisten vitamiinien määrien vertailu erilaisissa maidonlähteissä (Newton 2004). Vitamiinipitoisuus 800 millilitraa kohti:

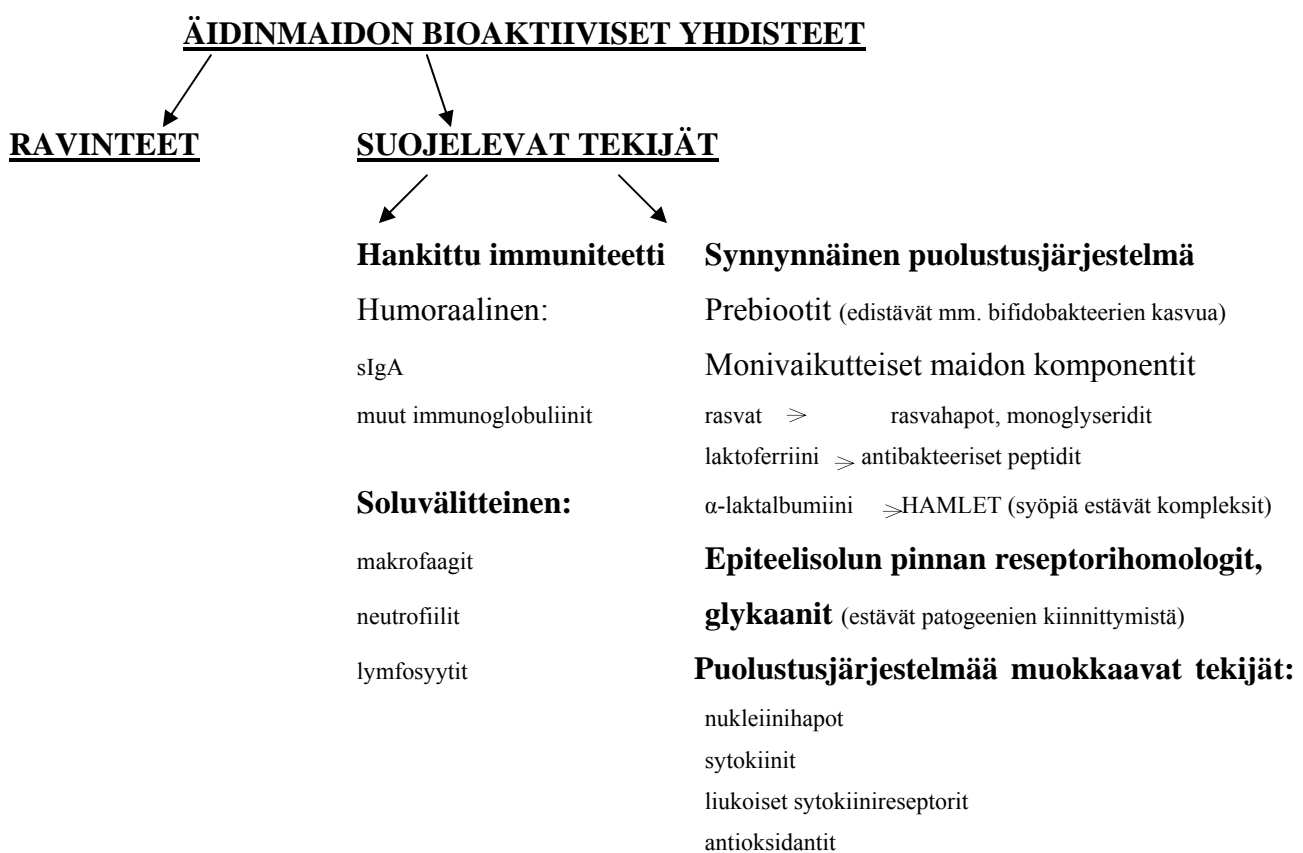
Vitamiini	Äidinmaito	Lehmänmaito	Korvike	RDA
tiamiini (B ₁) (µg)	160	344	67	300
riboflaviini (B ₂) (µg)	280	1160	100	400
niasiini (µg) (B ₃)	120	656	503	500
pyridoksiini (B ₆) (µg)	120	512	42	300
pantoteenihappo (B ₅) (mg)	2.0	2.7	1.7	2
biotiini (µg)	56	2.8	1.5	10
foolihappo (µg)	65	0.13	6.7	25
syankobalamiini (B ₁₂) (µg)	0.8	4.8	1.5	0.3
askorbiinihappo (C)	40	8.8	5.7	30

RDA = Yhdysvaltain ravitsemusneuvoston antama päivittäinen saantisuositus.

3.2 Antimikrobiset yhdisteet ja valkosolut

Vauva on herkkä infektioille, sillä puolustusjärjestelmä on vielä kehittymätön, hankittu immunitetti heikko ja suoliston normaalimikrobisto vaillinaisen (Newburg, 2005). Lisäksi pieni vauva ryömii maassa ja laittaa mielellään tavaroita suuhunsa, jolloin mikrobialtistus on voimakas.

Äidinmaidosta on löydetty useita yhdisteitä, kuten immunoglobuliineja, valkosoluja ja oligosakkarideja, jotka tukevat vauvan puolustusjärjestelmää (kuva I.6). Lisäksi monet äidinmaidon ravinteet estävät tulehduksia (Newburg 2005).



Kuva I.6 Äidinmaidon bioaktiivisia yhdisteitä. Monien äidinmaidon komponenttien tiedetään olevan antipatogeenisia, kuvassa joitain esimerkkejä. Osa voidaan luokitella ns. synnynnäiseen puolustusjärjestelmään, jonka avulla äiti suojelee vastasyntyntä patogeeneilta. Äidinmaidosta löydetään jatkuvasti uusia antimikrobisia yhdisteitä, mutta maidon komponentit vaikuttavat monella tapaa myös vauvan suolistossa, muun muassa mikrobistoon. Muokattu artikkelin Newburg (2005) kuvasta.

Viime vuosisadan alussa todettiin, että imetettyjen lasten sairastuvuus ja kuolleisuus tulehdustauteihin oli pienempi kuin korvikeruokittujen (katsaus: Newburg 2005). Nykyisin hygieniolosuhteet ovat länsimaissa hyvät ja korvikkeet vastaavat aiempaa paremmin äidinmaidon koostumusta, joten imetys ei ole ”elämän ja kuoleman kysymys”. Maailmanlaajuisesti imetyksen kuitenkin arvioidaan yhä estävän kehitysmaissa miljoonia vauvoja kuolemasta tulehdustauteihin vuosittain (Humphrey ja Iliff 2001). Kehitysmaissa hygieniolot ovat puutteelliset ja jauhemainen korvike saatetaan sekoittaa saastuneeseen veteen.

3.2.1 Vasta-aineet

Ensimmäiseksi äidinmaidon patogeeneja tuhoavista yhdisteistä löydettiin 1900-luvun alussa vasta-aineet, immunoglobuliinit. Niiden uskotaan olevan tärkein suoja suolistoinfektioita vastaan vauvaiässä (katsaus: Newburg ym. 2005).

Immunoglobuliini A (sIgA) muodostaa arviolta 90 % äidinmaidon immunoglobuliineista. Muitakin immunoglobuliineja (G, M, E, D) esiintyy, mutta huomattavasti vähemmän. Vasta-aineita on löydetty äidinmaidosta mm. *Streptococcus mutans*, *Str. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Campylobacter diarrhoea*, *C. jejuni*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* -bakteereita sekä difteriaa, B-ryhmän streptokokkeja ja pneumokokkeja vastaan. Lisäksi niiden on todettu estävän viruksia, kuten HIV, rotavirus, hepatiitti-B, poliovirus, VZV, CMV, herpes simplex ja RSV (Katsaus: May 1994).

3.2.2 Valkosolut

Äidinmaidon valkosolujen määrä vaihtelee imetyksen eri vaiheissa. Alkuvaiheen ternimaidossa valkosoluja on enemmän ($\sim 4 \times 10^9/l$) kuin myöhemmässä imetyksen vaiheessa ($\sim 10^8$ – $10^9/l$). Niiden uskotaan auttavan vauvan puolustusjärjestelmän kehittymisessä. Eläviä äidinmaidon valkosoluja on pystytty eristämään myös vauvan ulosteesta (Katsaus: Field 2005).

Makrofaageja on äidinmaidossa valkosoluista eniten (55–60 %), ja niiden uskotaan aktivoivan vauvan T- ja B-solujen toimintaa. Lisäksi ne ovat aktiivisia solunsyöjiä, kantavat mukanaan vastaainemolekyylejä (sIgA), sekä erittävät puolustusjärjestelmää sääteleviä tekijöitä. Neutrofiilien (30–40 % maidon valkosoluista) sen sijaan arvellaan lähinnä suojelevan äitiä rintatulehduksilta, sillä ne ovat maidossa vain heikosti aktiivisia (Field 2005).

Lymfosyyteistä (5–10 % maidon valkosoluista) suurin osa on T-soluja (>80 %). Ne ovat aktiivisia tappajasoluja, joiden arvellaan kompensoivan vastasyntyneen kehittymättömän puolustusjärjestelmän toimintaa, ja edistävän vauvan omien T-solujen kypsymistä. Field (2005)

arvelee, että tämä selittää miksi rintaruokituilla vauvoilla on havaittu kateenkorvan olevan kooltaan kaksinkertainen verrattuna korvikeruokittuihin (Hasselbalch ym. 1999). Kateenkorvan tiedetään toimivan T-solujen kypsymispaikkana.

3.2.3 Ravinteet antimikrobisina yhdisteinä

Monet äidinmaidon yhdisteet estävät mikrobeja, mutta toimivat samalla myös vauvan ravintona. Esimerkiksi lysotsyymi ja laktoferriini, jotka kuuluvat maidon pääasiallisiin proteiinilähteisiin, estävät myös bakteerien kasvua tai tappavat niitä (Lönnerdal 2003).

Suoran estovaikutuksen lisäksi useat äidinmaidon ravintokomponentit tuottavat antimikrobisia yhdisteitä hajotessaan vauvan vatsassa. Tällaisia ovat muun muassa äidinmaidon triglyseridit, joiden hajoamistuotteina syntyneet vapaat rasvahapot ja monoglyseridit estävät useiden bakteerien, virusten ja alkueläinten kasvua. Myös laktoferriinin, kaseiinin ja maidon muiden proteiinien osittaisessa hajoamisessa syntyvät peptidit ovat merkittäviä patogeenien estäjiä. Niitä on kutsuttu myös peptidiantibiooteiksi (Liepke ym. 2001). Antimikrobisten vaikutusten lisäksi äidinmaidon yhden yleisimmän proteiinin, alfa-laktalbumiinin on todettu vauvan vatsassa muodostavan myös syöpiä estäviä ns. HAMLET-yhdisteitä (Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) (Katsaus: Newburg 2005).

3.2.4 Oligosakkaridit ja muut glykaanit

Äidinmaidossa on yli sadan erilaisen oligosakkaridin lisäksi glykokonjugaatteja, joissa monimutkaiset hiilihydraattirakenteet ovat sitoutuneet lipidimolekyyleihin (glykolipidit), tai muihin makromolekyyleihin, muodostaen glykopeptidejä, glykoproteiineja, glykosaminoglykaaneja tai musiineja. Näitä kaikkia kutsutaan yhteisnimellä glykaaneiksi (taulukko I.6). Newburgin ym. (2005) mukaan glykaanit saattavat olla jopa ensisijainen patogeenien torjuntamekanismi rintamaitoa nauttivalla vauvalla. Niiden on nimittäin havaittu estävän patogeenien kiinnittymistä isäntäsolun reseptoriin, mikä on ratkaiseva vaihe infektiossa. Tämän arvellaan tapahtuvan siten, että oligosakkaridit toimivat reseptorianalogeina eli kilpailevat bakteerien kanssa kiinnittymispaikoista suoliston epiteelin pinnalla (Kunz ym. 2000).

Oligosakkaridit ovat erittäin pysyviä vauvan suolistossa, joissain tutkimuksissa noin 90 % niistä kulkeutui suoliston läpi muuttumattomina, ja 1 % poistui virtsan mukana. Kulkeutuminen ulosteeseen ja virtsaan kuitenkin riippuu myös siitä, miten paljon vauvan suolistobakteeristo käyttää niitä ravintonaan (Ward ym. 2006). Newburgin ym. (2005) mukaan oligosakkaridien määrä on vauvan ulosteessa noin kymmenkertainen äidinmaitoon verrattuna eli ne väkevöityvät suolistossa.

Oligosakkarideissa on, paitsi patogeeneja estäviä yhdisteitä, mahdollisesti myös bifidobakteerien kasvua edistäviä yhdisteitä, "bifidotekijöitä". Yksi tällainen yhdiste on luultavasti gynolaktoosi, joka on noin kymmenen oligosakkaridin seos (Katsaus: Kunz ym. 2000).

Taulukko I.6 Äidinmaidon glykaaneja, jotka inhiboivat patogeeneja (Newburg ym. 2005).

Glykaani	Patogeeni/toksiini	Tyypillinen konsentraatio
GM1	Labiilitoksiini, koleratoksiini	180 µg/l
GM3	Enteropatogeeninen <i>E. coli</i> (EPEC)	13 mg/l
Gb ₃	Shigatoksiini	100-150 µg/l
Sulfatiidi	HIV	100 µg/l
Kondroitiinisulfaatti	HIV	6 mg/l
Laktadheriini	Rotavirus	100 µg/l
Musiini	<i>E. coli</i>	1 g/l
Mannosyloitu glykopeptidi	Enterohemorraginen <i>E. coli</i> (EHEC)	60 mg/l
Oligosakkaridit	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,2-10 g/l
	EPEC	3 g/l
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3 g/l
Fukosyloidut oligosakkaridit	<i>Campylobacter jejuni</i>	1-25 mg/l
	<i>Vibrio cholerae</i>	1-25 mg/l
	ST-toksiini	40 µg/l
Makromolekyyleihin sitoutuneet glykaanit	Norovirukset	370 mg/l
Sialyylilaktoosi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Koleratoksiini	200 mg/l
	<i>E. coli</i>	
	<i>P. aeruginosa</i>	
	<i>Aspergillus fumigatus</i> -itiöt	
	Influenza virus	
	Polyomavirus	
	<i>Helicobacter pylori</i>	

4 Äidinmaidon mikrobit

Vaikka äidinmaito sisältääkin monia antimikrobisia yhdisteitä, se ei ole steriiliä. Bakteerien alkuperää ei kuitenkaan tarkkaan tiedetä.

Aiemmat äidinmaidon mikrobiologiset tutkimukset ovat keskittyneet tautia-aiheuttavien bakteerien ja virusten etsimiseen maitonäytteistä (Caroll ym. 1979, Eidelman ja Szilagy 1979, Law ym. 1989, Bingen ym. 1992, El-Mohandes ym. 1993a ja 1993b, Wright ja Feeney 1998, Novak ym. 2000, LeThomas ym. 2001). Tämä on ymmärrettävää, sillä patogeenisten mikrobien torjuminen on

tärkeää sairaaloiden äidinmaitopankeissa. Niihin kerätään maitoa varastoon annettavaksi keskosina syntyneille vauvoille ja sellaisille, joiden äidit eivät vielä imetyksen alkuvaiheessa tuota sitä riittävästi.

Viime vuosina tutkijat ovat kiinnostuneet äidinmaidon "hyvästä" luontaisesta bakteeristosta (Tämä tutkimus, Beasley ja Saris 2004, Martin ym. 2003, 2005, 2006). Normaalibakteeriston eli "normaaliflooran" on todettu estävän taudinaiheuttajia mm. suolistossa (Mikelsaar ym. 2004), suussa (Uehara ym. 2001), ylemmissä hengitysteissä (Brook 2005) sekä virtsa- ja sukuelinten alueella (Larsen ja Monif 2001). Tämän vuoksi bakteeriterapiasta, jossa tautia-aiheuttavat bakteerit korvataan elimistön normaaleilla, "hyvillä" bakteereilla, toivotaan asetta taudinaiheuttajia vastaan. Erityisesti antibiooteille vastustuskykyisten bakteerien tuhoamiseen bakteeriterapia tarjoaa uusia keinoja (Huovinen 2001).

Tämä tutkimus (tulokset työn loppuosassa) oli ensimmäinen laaja äidinmaidon anaerobisen/fakultatiivisesti anaerobisen bakteeriston kartoitus (Heikkilä ja Saris 2003). On kuitenkin huomioitava, että tutkimuksessa käytettiin viljelymenetelmiä, jotka valikoivat vain kyseisissä olosuhteissa (anaerobia, MRS- tai LBS-kasvualusta, 37°C) kasvavat bakteerit. Viljelymenetelmillä ei koskaan saada täydellistä kuvaa bakteerilajistosta.

Tutkimuksen kuluessa on ilmestynyt tutkimuksia äidinmaidon mahdollisesti probioottisista bakteerikannoista (Martin ym. 2003, 2005, 2006). Erityisesti maitohappobakteerit ovat olleet kiinnostuksen kohteena, sillä niitä pidetään yleisesti turvallisina.

Vaikka tietoa äidinmaidon bakteeristosta on nyt aiempaa enemmän, normaaliflooran merkityksestä patogeenien estossa ei juuri tiedetä. Viitteitä on siitä, että rintamaidon bakteerit kykenevät estämään taudinaiheuttajien kasvua (tämä tutkimus, Martin ym. 2005, 2006).

4.1 Bakteerien alkuperä

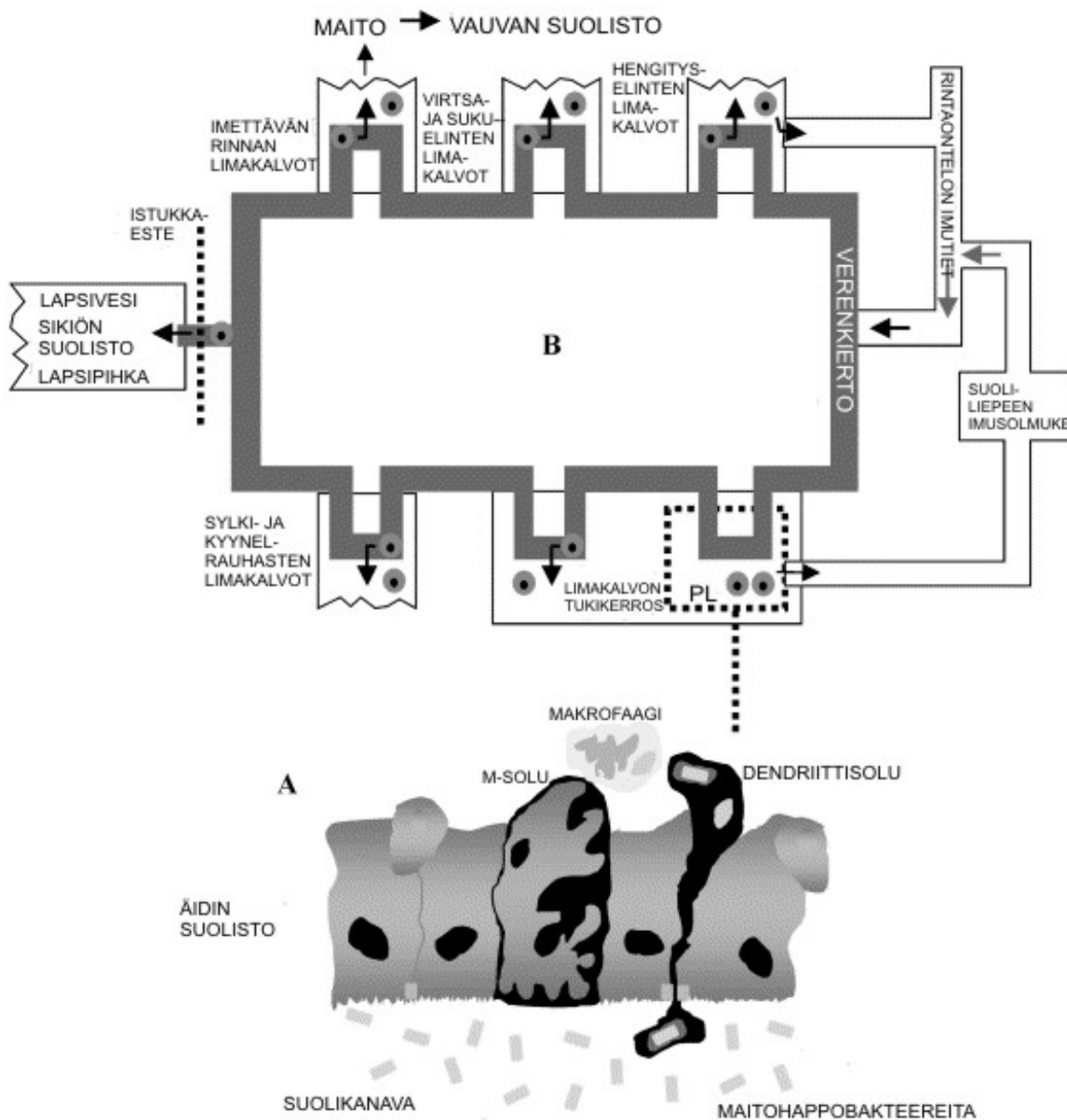
Vielä ei tarkkaan tiedetä, miten mikrobit päätyvät äidinmaitoon. On myös hämärän peitossa, miten paljon bakteereita on rinnan sisällä maitotiehyissä tai maitorakkuloissa, vai onko niitä, sillä aseptinen näytteenotto rinnan sisältä on hankalaa. Erilaisia olettamuksia bakteerien päätymisestä äidinmaitoon on kuitenkin esitetty useita. Vanhimman teorian mukaan pääosa bakteereista, stafylokokkeja, tulee maitoon näytteenoton yhteydessä nänнин iholta (West ym. 1979). Eidelman & Szilagy (1979) osoittivat, että äidin nännin pinnalla ja maidossa esiintyy lajistoltaan samankaltaisia bakteereita. Lisäksi osa bakteereista, oraalisia streptokokkeja, siirtyy luultavasti vauvan suusta tai nenästä äidin rinnan iholle ja sitä kautta maitoon (West ym. 1979). Yhtenä mahdollisena äidinmaidon bakteerilähteenä pidetään myös synnytyskanavaa, josta vauva voi ottaa tullessaan bakteereita suuhunsa ja siirtää ne maitoon imetyksen aikana (Atkins ym. 1998).

Viime vuosina on kehitetty myös uusia teorioita selittämään äidinmaidon bakteerien alkuperää. Niiden mukaan bakteereita pääsee kulkeutumaan rintamaitoon myös elimistön sisäisiä reittejä, verenkiertoa ja imuteitä, pitkin (Qutaishat ym. 2003 ja Martin ym. 2004). Tämä hypoteettinen reitti on esitetty kuvassa I.7.

Uusi reittivaihtoehto tukeutuu havaintoon, jonka mukaan useat patogeeniset bakteerit, kuten salmonella, pystyvät tunkeutumaan elimistöön ohutsuolen seinämän läpi nk. M-solujen kautta (Katsaus: Lu ja Walker 2001). M-solut ovat erilaistuneita epiteelisoluja, jotka sijaitsevat seinämän imukerässikermissä, nk. Peyerin levyissä. Kun bakteeri tunkeutuu suolen seinämän läpi, puolustusjärjestelmän fagosyyttinen valkosolu, kuten makrofaagi, syö sen. Patogeeni ei kuitenkaan hajoa, vaan kykenee jopa lisääntymään makrofaagin sisällä. Sitä kautta se pääsee myös kulkeutumaan imuteihin ja verenkiertoon. Qutaishat ym. (2003) uskovat, että *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 siirtyi äidin suolistosta rintamaitoon juuri edellä kuvattua reittiä, ja aiheutti infektion vastasyntyneillä kaksosilla.

Päästäkseen elimistöön M-solujen kautta bakteerilla täytyy olla erityisiä invaasiogeneja, joiden koodaamat proteiinit auttavat patogeenia tunkeutumaan elimistöön. Toisaalta on kuitenkin havaittu, että ilman näitä kyseisiä geenejäkin *Salmonella typhimurium* voi päästä suolistosta pernaan (Galan ja Curtiss 1989). Tämän ilmiön saattaa selittää Rescignon ym. (2001) kuvaama vaihtoehtoinen reitti, joka kulkee nk. dendriittisolujen kautta. Näitä puolustusjärjestelmän fagosytoottisia valkosoluja esiintyy eri kudoksenteissa, muun muassa suolen epiteelin tuntumassa. Dendriittisolut kykenevät aukaisemaan tilapäisesti epiteelisolujen välisen tiiviin liitoksen ja nappaamaan bakteeri- ja antigeeninäytteitä. Niiden tehtävä on kuljettaa näytteet imusolmukkeeseen ja esitellä ne puolustusjärjestelmän T-soluille. Tämä puolustusmekanismi voi kuitenkin toimia myös patogeenin tunkeutumisreitillä, mikäli bakteeri selviää ja kykenee lisääntymään solujen sisällä.

Martin ym. (2004) uskovat, että kyseisellä mekanismilla myös pieni määrä äidin suoliston normaalibakteeristoa voi kulkeutua imuteitse rinnan limakalvolle. Heidän mukaansa tämä voisi selittää äidin suolistosta lähtöisin olevien maitohappobakteerien esiintymisen maidossa. Lisäksi se selittäisi Martinin ym. (2004) alustavasti havaitseman äidinmaidolle tyypillisten bakteerien esiintymisen kolostrumissa jo ennen imetystä. Sama ryhmä on myös tutkinut istukkaverta ja lapsivettä ja uskoo, että myös niihin pääsee bakteereita verenkierron ja imuteiden kautta (Jimenez ym. 2005). Lisätutkimuksia tämän reitin olemassaolosta kuitenkin tarvitaan.



Kuva I.7 Martinin ym. kuvaama (2004) hypoteettinen malli äidin suoliston maitohappobakteerien siirtymisestä sikiön ja vauvan suolistoon. A) Immuunijärjestelmän dendriittisolut voivat läpäistä suolen epiteelin ja ottaa maitohappobakteereja suoraan suolikanavasta (Rescigno ym. 2001). B) Dendriittisolun sisällä maitohappobakteeri pääsee imukudokseen, josta se voi kulkeutua imuteitä pitkin muun muassa rintarauhasen limakalvoille. Toinen mahdollinen reitti, jota suolistosta tunkeutuvien patogeenien tiedetään käyttävän, kulkee M-solujen kautta. Ne ovat erilaistuneita epiteelisoluja, joita on ohutsuolen seinämän laajoissa imukerässikermisissä, ns. Peyerin levyissä (PL). Kuva on muokattu artikkelista Martin ym. (2004).

4.2 Tyypillinen bakteeristo

Yleisimmin äidinmaidossa esiintyviksi lajeiksi on useissa tutkimuksissa todettu normaaliflooran stafylokokit ja alfa-hemolyttiset streptokokit, joita on löydetty yleensä myös määrällisesti eniten (West ym. 1979, Eidelman ja Szilagyi 1979, Law ym. 1989). Monia muitakin lajeja äidinmaidosta on löydetty, mutta niiden esiintyminen on ollut harvinaisempaa, ja vaihdellut riippuen käytetyistä viljelymenetelmistä (taulukko I.7). Tarkemmin, lajitasolle asti, ei äidinmaidon normaalibakteeristoa ole ennen tätä tutkimusta tunnistettu, sillä kiinnostus on ollut lähinnä patogeeneiden seulonnassa. Lisäksi suurin osa tutkimuksista on tehty aikana, jolloin ei vielä ollut käytössä molekyylibiologisia menetelmiä bakteerien tunnistamiseksi.

Taulukko I.7 Äidinmaidon hygieenisen laadun seuloinnoissa yleisimmin maidosta löydettyt bakteerilajit. Taulukossa on prosentteina monessako äidinmaitonäytteessä tutkituista kyseinen bakteerilaji/-ryhmä esiintyi. Sarakkeissa on lihavoituna tutkimuksessa mukana olleiden äitien määrä ja suluissa tutkittujen näytteiden kokonaismäärä. Tyhjiksi jääneet kohdat kertovat, ettei kyseistä bakteeria/bakteeriryhmää ole erikseen tutkittu.

	a) 17 (348)	b) 95 (95)	c) 30 (30)	d) 96 (7610)	e) 44 (44)	f) 40 (108)	g) 70 (207)	h) 21 (21)
<i>Acinetobacter</i> sp.	13			33	2	18		9
<i>Bacillus</i> sp.		5		3				5
<i>Diphtheria</i> sp.		8		6		13		5
<i>Enterobacter</i> sp.	1			18			7	5
<i>Enterococcus</i> sp.	0,3		14		5	13		
<i>Escherichia coli</i>	9		26	6	2			5
<i>Flavobacterium</i> sp.		1		2				14
<i>Klebsiella</i> sp.	14			6	2	1		
<i>Micrococcus</i> sp.		96						29
<i>Moraxella</i> sp.				4				33
<i>Pseudomonas</i> sp.	1			19				14
<i>Staphylococcus</i>								
<i>aureus</i> /koagulaasiposit.		19	7	21	20	13	13	24
<i>epidermidis</i> /koagulaasinegat.	45		77	95	98	95		95
<i>Streptococcus</i>								
alfa-hemolyttiset/viridans		21	40	43	27			43
beta-hemolyttiset				1			2	
ei-hemolyttiset		30		12				29

Lähteet: a) Wright ja Feeney 1998, b) Wright 1947, c) Ajusi 1989, d) Law ym. 1989, e) Eidelman ja Szilagyi 1979, f) El-Mohandes ym. 1993, g) Carrol ym. 1979, h) West ym. 1979.

4.2.1 Stafylokokit

Äidinmaidon pääryhmä, stafylokokit, on luokiteltu aiemmissa tutkimuksissa karkeasti, koagulaasinegatiivisiin ja -positiivisiin. Erityisen yleiseksi äidinmaidon lajiksi on useissa tutkimuksissa mainittu koagulaasinegatiiviset stafylokokit, erityisesti *Staphylococcus epidermidis* (West ym. 1979, Eidelman ja Szilagyi 1979). Se on potentiaalisesti patogeeninen laji, mutta

äidinmaidon kannat ovat yleensä todettu harmittomiksi. Koagulaasipositiivinen *Staphylococcus aureus*-bakteeri on ollut erityisen kiinnostuksen kohteena, sillä se voi aiheuttaa vastasyntyneelle vakavia tulehduksia sekä äidille rintatulehduksia. Bakteeria on esiintynyt noin 7-24 prosentissa eri äideiltä saaduista maitonäytteistä (taulukko I.7). Muita stafylokokkilajeja ei ole erikseen tunnistettu.

4.2.2 Streptokokit

Äidinmaitonäytteiden streptokokit on aiemmissa tutkimuksissa luokiteltu metabolisin testein *Streptococcus viridans* -ryhmään eli normaaliflooran streptokokkeihin kuuluviksi, tai veriagarin hemolyysireaktion perusteella alfa- ja betahemolyyttisiin, sekä ei-hemolyyttisiin. Tarkemmasta lajikoostumuksesta ei ole ollut tietoa ennen tätä tutkimusta.

4.2.3 Maitohappobakteerit

"Perinteisistä" *Lactobacillus*-, *Lactococcus*-, *Leuconostoc*-, *Pediococcus*-sukuisista maitohappobakteereista oli, ennen tätä tutkimusta, eristetty äidinmaidosta ainoastaan laktobasilleja. Streptokokkeja ja enterokokkeja, jotka myös luetaan maitohappobakteereihin, sen sijaan oli havaittu yleisesti rintamaidossa (taulukko I.7).

Wright ym. (1947) löysivät äidinmaidosta anaerobisessa kasvatuksessa yhden laktobasillin (ei lajitunnistusta) ja West ym. (1979) yhdestä näytteestä *Lactobacillus plantarum* -bakteerin. Suomessa on Ingmanilla käytössä meijerituotteissa probioottina (Rela) alunperin äidinmaidosta eristetty *Lb. reuteri* MM53/SD2112 -kanta (Reid 1999). Aiemmissa tutkimuksissa löydettyjen maitohappobakteerien vähäinen määrä johtuu luultavasti siitä, ettei niitä ole varsinaisesti etsitty äidinmaidosta, eivätkä käytetyt kasvualustat ja aerobiset olosuhteet ole suosineet niiden kasvua.

Tämän tutkimuksen osajulkaisun (Heikkilä ja Saris, 2003) ilmestymisen jälkeen useat tutkijat ovat kiinnostuneet rintamaidon maitohappobakteereista (Martin ym. 2003, 2005, 2006, Olivares ym. 2006, Sinkiewicz ja Nordström 2005). Martin ym. (2003) löysivät kaikista (n = 8) tutkimistaan äidinmaitonäytteistä *Lactobacillus gasseri*- ja *Enterococcus faecium*-bakteereita. Lisäksi he eristivät yhden *Lb. fermentum* -kannan ja myöhemmin yhden *Lb. salivarius* -kannan (Martin ym. 2006). Näistä äidinmaidon laktobasilleista Puleva Biotech -niminen yritys kehittää uusia probioottisia maitohappobakteerivalmisteita (Olivares ym. 2006).

Sinkiewicz ja Nordström (2005) löysivät alustavissa tutkimuksissaan 12 prosentista äidinmaitonäytteistä (n = 226) *Lb. reuteri* -bakteereja. Näytteet olivat eri puolilta maailmaa. He havaitsivat eroja laktobasillien esiintymisessä rintamaidossa eri maissa sekä riippuen siitä, asuiko äiti maaseudulla vai kaupungissa. Puolessa maaseudulta ja noin viidenneksessä kaupunkialueelta saaduista näytteistä esiintyi laktobasilleja. Bifidobakteereita he löysivät lähes kaikista Japanin ja

Korean maaseudulta saaduista näytteistä, toisin kuin Tanskasta, Perusta ja Ruotsista, joissa kyseisiä bakteereita esiintyi maidossa vain vähän tai ei ollenkaan.

Beasley ja Saris (2004) löysivät kuudesta eri äidiltä saadusta maitonäytteestä (n = 20) *L. lactis* -kantoja, yhteensä 20 kantaa. Näistä seitsemän kantaa tuotti bakteriosiinia, nisiiniä.

4.3 Patogeenit

Äidinmaidossa voi esiintyä patogeeneja, jotka voivat olla vaarallisia vastasyntyneelle. Imetyksen edut ovat kuitenkin yleisesti niin paljon suuremmat kuin riskit, ettei tämän vuoksi suositella imetyksestä luopumista. Virusten ja bakteerien siirtyminen äidinmaidon kautta on yleisesti ottaen harvinaista. Ainoastaan erityistapauksissa, kuten HIV-positiivisilla äideillä, imetystä ei suositella.

4.3.1 Patogeeniset bakteerit

Äidinmaidon aiheuttamat bakteeritulehdukset ovat harvinaisia, tutkimukset kuvaavat lähinnä joitain yksittäistapauksia. Terveelle vastasyntyneelle äidinmaidon bakteerit, vaikka joukossa olisi patogeenejakin, eivät yleensä aiheuta oireita. Keskokset ovat kuitenkin riskiryhmässä. Suurin osa osoitetuista tartunnoista onkin todettu keskosvauvoilla. Muun muassa *Staphylococcus aureus*-, *Streptococcus agalactiae*-, *Salmonella*- ja *Klebsiella pneumoniae* -bakteerien on todettu siirtyneen ja aiheuttaneen tulehduksia vauvalle äidinmaidon kautta.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus voi aiheuttaa useita erilaisia tulehduksia, joista vastasyntyneille vakavimpia ovat verenmyrkytys ja keuhkokuume. Arviot bakteerin esiintymisestä äidinmaidossa ovat vaihdelleet noin 15–20 prosentin välillä (taulukko I.7). Wrightin ym. (1947) tutkimuksessa *Staph. aureus* löytyi 18:ssä näytteestä 95:stä, Law ym. (1989) löysivät sen puolestaan 20:ssä näytteessä 96:sta ja West ym. (1979) viidessä 21:stä. Vaikka se oli siis suhteellisen yleinen äidinmaidossa, tulehdukset maidon kautta ovat harvinaisia.

Le Thomas ym. (2001) osoitti Panton-Valentine-leukosidiinia (PVL) tuotavan *Staph. aureus* -kannan aiheuttaneen äidinmaidon kautta keuhkokuumeen vauvalle. Behari ym. (2004) puolestaan osoittivat pahamaineisen MRSA:n eli metisilliiniresistentin *Staph. aureus* -kannan siirtyneen maidon kautta ja aiheuttaneen verenmyrkytyksen ja sidekalvotulehduksen keskosina syntyneille kaksosille. Myös Gastelum ym. (2005) totesivat MRSA:n siirtyneen pumpatun äidinmaidon kautta keskosina syntyneille nelosille, joista yksi menehtyi verenmyrkytykseen. Kawada ym. (2003) osoittivat, että MRSA voi siirtyä täysin oireettomilta äideiltä maidon mukana aiheuttamatta oireita terveille vauvoille.

Ryhmän B streptokokit eli *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae on yleisin vastasyntyneiden vakavien tulehdusten, kuten verenmyrkytysten, aiheuttaja. Useimmiten, noin 90 prosentissa tapauksista, se tarttuu sikiöveden välityksellä tai synnytyskanavasta ja ilmenee 12 tunnin kuluessa syntymästä (Hickman ym. 1999). Rintamaito on vain harvoin tartuntalähde. Keskosina syntyneet ovat kuitenkin herkempiä tulehduksille, ja maidon kautta onkin siirtynyt tartuntoja äidistä keskosvauvalle (Godambe ym. 2005, Olver ym. 2000, Atkins ym. 1998, Bingen ym. 1992). Tutkimuksissa olleet äidit olivat yleensä itse täysin oireettomia.

Salmonella

Useiden salmonella-lajien on todettu siirtyneen äidinmaidon kautta. Tapauksia on kuitenkin vähän. *Salmonella kottbus* on aiheuttanut ongelmia erityisesti sairaalojen äidinmaitopankeissa, *S. senftenberg* ja *S. enterica* serotyypit Typhimurium ja Panama ovat siirtyneet imetettäessä terveeltä äidiltä vauvalle (Qutaishat ym. 2003, Chen ym. 2005). Bakteerit ovat aiheuttaneet muun muassa suolisto- ja verenmyrkytysoireita.

Klebsiella pneumoniae

Keuhkokuumetta aiheuttava *Klebsiella pneumoniae* on aiheuttanut harvinaisina yksittäistapauksina verenmyrkytyksiä äidinmaitopankkeihin luovutetun maidon kautta (Donowitz ym. 1981) sekä imetyksessä keskosvauvoille (Godambe ym. 2005).

Muut patogeeniset bakteerit

Edellä mainittujen lisäksi äidinmaidon on havaittu, harvinaisina yksittäistapauksina, aiheuttaneen mm. *Mycobacterium tuberculosis*-, *Escherichia coli*-, *Listeria monocytogenes*- ja *Coxiella burnetii* -tartuntoja (Katsaus: Jones 2001).

4.3.2 Virukset

Melko useat virusinfektiot voivat siirtyä äidinmaidon kautta. Useimmiten virus joko infektoi rinnan epiteelisoluja tai äidinmaitoon erittyviä puolustusjärjestelmän valkosoluja, monosyyttejä. Niiden kautta se pääsee maitoon joko vapaina viruspartikkeleina tai valkosolujen sisällä. Rintatulehduksen on todettu lisäävän virusten kulkeutumista (kappale 4.4).

Tavallisimmat äidinmaidon kautta tarttuvat virukset ovat HIV, CMV (sytomegalovirus) ja HTLV (T-soluleukemiavirus). Muita äidinmaidon kautta mahdollisesti harvinaisesti tarttuvia viruksia ovat

muun muassa rubella (vihurirokko), herpes simplex, hepatiitti-B (maksatulehdus), EBV (Epstein-Barr-virus, mononukleoosi) ja HHV6 (vauvarokko). Arvioiden mukaan tartunta-asteet ovat sytomegalovirukselle 40–76 % , rubellavirukselle 25–50 %, HTLV-1 -virukselle 80 % ja HIV-1 -virukselle 5–66 % (Katsaus: Michie ja Gilmour 2001). Vaihteluväli on laaja, mikä osoittaa tartuntalähteen selvittämisen vaikeutta.

HIV

HI-viruksen (Human Immuno-deficiency virus) siirtyminen äidinmaidon kautta on ollut jo useiden vuosien ajan yksi tärkeä tutkimusaihe virologiassa (Katsaukset: Humprey ja Iliff 2001, Dorosko 2005). Vuonna 2004 noin 640 000 alle 15-vuotiaasta lasta sai HIV-tartunnan ja noin puoli miljoonaa kuoli AIDSiin. Tartunta siirtyy useimmiten äidiltä lapselle istukan, synnytyskanavan tai rintaruokinnan kautta. Äidinmaidon kautta on arvioitu siirtyvän kolmanneksen tai jopa puolet infektioista, eli arviolta 200 000–300 000 tartuntaa vuosittain (Humprey ja Iliff 2001).

Länsimaissa ja muissa kehittyneissä maissa HIV-positiivisia naisia kehoitetaan pidättäytymään kokonaan imettamisestä. Köyhissä kolmansissa maissa tilanne on kuitenkin monimutkaisempi. Mikäli vauvaa ei imetetä, riski kuolla ripuliin tai hengitystieinfektioihin arviolta kuusinkertaistuu, sillä puhtaan veden saatavuus ja hygieniolosuhteet ovat heikot (WHO 2004).

Maailman terveysjärjestön (WHO) ja Yhdistyneiden kansakuntien (UNAIDS ja UNICEF) nykyisen suosituksen mukaan HIV-positiivinen äidille pitää kertoa molemmat vaihtoehdot ja kertoa tartuntariskistä. Jos korvikemaidon käyttö on turvallista, puhdasta vettä on saatavilla ja hygieniolosuhteet riittävän hyvät, suositellaan imetyksen välttämistä. Muussa tapauksessa suositellaan täysimetystä ensimmäisten elinkuukausien aikana. Osittaisimetys lisää tartuntoja. Lisäksi tulee pyrkiä estämään rintatulehduksia (WHO 2004).

HIV-tartuntoja pystytään jonkin verran vähentämään antamalla äidille ennen synnytystä ja vauvalle syntymän jälkeen anti-retroviruslääkettä (nevirapiini). Nevirapiini laskee äidinmaidon HI-virusten määrää ja siten tartuntatodennäköisyys laskee (Katsaus: McIntyre 2006).

Sytomegalovirus

Sytomegaloviruksen on jo 1960-luvulla todettu yleisesti tarttuvan äidinmaidon kautta. Se on yksi yleisimmistä vastasyntyneen vauvan infektioista. Sen esiintymistä maidossa on tutkittu laajasti (Katsaus: Schleiss 2006), mutta lääketieteellisiin seuraamuksiin on kiinnitetty vain vähän huomiota, sillä terveellä vastasyntyneellä tartunta on lähes aina oireeton.

Tietyissä tapauksissa, etenkin keskosvauvoille, tartunta äidinmaidon kautta voi kuitenkin olla vaarallinen. Se voi aiheuttaa muun muassa verenmyrkytyksen tyyppisen oireyhtymän, sydämen

hidaslyöntisyyttä, suolipullistumia sekä valkosolujen ja verihiukkasten määrän vähenemistä. Suurin osa, 66–93 % , seropositiivisista äideistä erittää virusta rintamaitoon. Tartunnan virusta sisältävästä rintamaidosta saa noin 10–76 % vauvoista (Schleiss 2006, Michie ja Gilmour 2001).

Tartuntaa pystytään estämään joko kuumentamalla rintamaito tai pakastamalla se ennen vauvalle antamista. Tavallinen toimenpide on antaa pienipainoisille keskosille vasta-ainevalmistetta CMV:n torjumiseksi. Antiviraalinen lääke (ganciclovir) voi auttaa verenmyrkytysoireista kärsiviä keskosvauvoja (Schleiss 2006).

HTLV

Ihmisen T-soluleukemiaa aiheuttava HTL-virus (Human T-lymphotropic virus) siirtyy äidistä lapseen pääasiallisesti rintamaidon kautta. Virus esiintyy endeemisenä tietyillä alueilla Etelä- ja Pohjois-Amerikassa, Etelä-Afrikassa, Uudessa-Seelannissa, Karibialla ja Japanissa, jossa se on erityisen yleinen. Muualle maailmaan se on kulkeutunut lähinnä siirtolaisten mukana. Japanissa tietyillä alueilla seropositiivisia on 6–37 %. Euroopassa virus on harvinainen, esiintyvyys on vain muutaman promillen luokkaa (Katsaus: Fujino ja Nagata 2000).

Viruksen aiheuttama aikuisen T-soluleukemia on vakava verisolusyöpä ja ennuste on huono. Diagnoosin jälkeen potilas kuolee keskimäärin 8 kuukaudessa, kemoterapia ei tehoa. Kuoleman aiheuttaa yleensä vakava hengitystieinfektio tai hyperkalsemia. Onneksi HTLV-tartunnan saaneista vain pieni osa, 3–5 % sairastuu. Lisäksi virustartunnan jälkeinen latentti vaihe on erittäin pitkä, usein vuosikymmeniä, minkä vuoksi tauti puhkeaa vasta aikuisiällä (Bazarbachi ym. 2004).

Seropositiivisten äitien aiheuttamaa vauvan tartuntariskiä voidaan alentaa rajoittamalla rintaruokinnan kesto alle puoleen vuoteen. Myös maidon pakastaminen poistaa virusten tartuntakyvyn (Fujino ja Nagata 2000).

4.3.3 Parasiitit

Yleisesti äidin loisinfektio ei aiheuta riskiä imetyksen yhteydessä vauvalle. Ainoastaan yhdessä tutkimuksessa on epäilty parasiitin, *Toxoplasma gondiin* aiheuttaman kuumetaudin, kulkeutuneen äidinmaidon kautta vauvalle. Tämän vuoksi ei kuitenkaan kehoiteta äitejä, joilla on toksoplasmoosi, pidättäytymään imetyksestä (Katsaus: Jones 2001).

4.4 Rintatulehdus

Mastiitti eli rintatulehdus on maitorakkuloiden välisen sidekudoksen tulehdus. Oireena on korkea kuume (38,5 °C tai enemmän), maidontuotannon väheneminen, flunssantyyppiset kivut ja väristykset, sekä punainen, arka, kuuma ja turvonnut alue rinnassa. Arviolta 11 prosentilla

rintatulehduksen saaneista maidontuotanto tyrehtyy kokonaan, mutta se on harvinaista ensimmäisten kuuden viikon jälkeen (Jonsson ja Pulkkinen 1994).

Rintatulehdus on melko yleinen imettävillä naisilla, arviot yleisyydestä vaihtelevat viiden ja 33 prosentin välillä (Katsaus: Michie ym. 2003). Suomessa esiintyvyydeksi on arvioitu 24 % imettävistä äideistä (Jonsson ja Pulkkinen 1994). Useimmiten (74–95 %) rintatulehdus havaitaan ensimmäisten kolmen kuukauden aikana synnytyksestä. Joillain äideillä tulehdus voi myös uusiutua.

Tavallisin rintatulehduksen syy on maidon pakkautuminen rintaan. Tiehyttukos voi jo yksistäänkin, ilman bakteeritulehdusta, aiheuttaa kipua ja kuumetta. Perinteiseen hoitoon kuuluu hierontaa, yrttejä ja kylpyjä, joiden avulla rinta pyritään tyhjentämään. Tiehyttukosten lisäksi rintatulehdusten syntyä edistävät muun muassa ihon haavaumat ja vaurioituminen, huono hygienia, vauvan tehoton imutekniikka, sekä maidon alhainen valkosolujen, laktoferriinin ja lysotsyymiin määrä (Katsaus: Michie ym. 2003).

Staphylococcus aureus on yleisin rintatulehdusbakteeri, aiheuttaen ainakin 50 % kliinisistä rintatulehduksista. Streptokokkeja, gram-negatiivisia sauvabakteereja, kuten *Escherichia coli*, ja sekakasvustoa havaitaan myös usein tulehdusten yhteydessä. Harvinaisempia rintatulehdusten aiheuttajia ovat salmonellat, mykobakteerit (*M. tuberculosis*) sekä *Candida*- ja *Cryptococcus*-sukuiset hiivat (Michie ym. 2003). Maidossa esiintyvistä bakteereista huolimatta rintatulehdus ei tavallisesti aiheuta ongelmia imevälle vauvalle ja imetystä suositellaan jatkettavan koko ajan, myös antibioottihoidon aikana (Jones 2001).

Rintatulehduksen aikana bakteerien ja tulehdussolujen vaikutuksesta maitorakkuloiden epiteelisolujen tiiviit liitokset (kappale 2.2.4) rakoilevat. Tällöin maitoon pääsee normaalia enemmän muun muassa natriumia ja veren valkosoluja. Mastiitin aikana maidossa on mm. puolustusjärjestelmän dendriittisoluja, jotka voivat kuljettaa viruksia sisällään. Virusten siirtyminen onkin todennäköisempää rintatulehduksen aikana, esim. HIV tarttuu 2–4 kertaa helpommin (Michie ym. 2003).

Edellä kuvatun kliinisen rintatulehduksen lisäksi ihmisillä, kuten lehmilläkin, on todettu ns. subkliinistä mastiittia, joka voi olla lähes krooninen. Sen arvellaan olevan yleisempi kuin kliinisen mastiitin, mutta esiintyvyyttä on vaikea todeta, sillä tyypilliset oireet puuttuvat. Käytännössä subkliininen mastiitti havaitaan lehmillä ja ihmisillä muun muassa pitkäaikaisena maidon määrän vähenemisenä sekä maidon normaalia korkeampina natrium-, immunoglobuliini-, lysotsyymi- ja laktoferriinipitoisuuksina (Katsaus: Filteau 2003).

Se, miten tulehdusta aiheuttava bakteeri pääsee maitorakkuloihin, on yhä epäselvää. Useita erilaisia reittivaihtoehtoja on esitetty: maitotiehyitä pitkin nännistä, verenkierron kautta tai nännin haavaumasta/halkeamasta imuteitse. Nännin haavaumien on todettu lisäävän rintatulehdusriskiä,

joten ne muodostavat luultavasti ainakin yhden infektioreitin (Katsaus: WHO 2000). Martin ym. (2004) uskovat, että bakteerit pystyvät elimistössä kulkemaan verenkierron kautta rintamaitoon. Lisätutkimukset ovat kuitenkin tarpeen.

5 Vauvan suolistomikrobisto

Perinteisesti on ajateltu, että vauva on steriili ennen syntymää. Bakteerien kolonisaation ajatellaan alkavan synnytyksen yhteydessä, jolloin vauva saa synnytyskanavasta tullessaan äidin emättimen ja suoliston bakteereita (Harmsen ym. 2000).

Jimenez ym. (2005) sen sijaan uskovat, että äidiltä voi siirtyä normaalibakteeristoa täysiaikaiselle sikiölle jo ennen syntymää. Ryhmä eristi yhdeksän äidin istukkaverestä (n = 20) *Enterococcus*-, *Streptococcus*-, *Staphylococcus*- ja *Propionibacterium*-sukuisia bakteerilajeja. Tämä ryhmä osoitti lisäksi, että *Enterococcus faecium* –bakteeri siirtyi tiineellä hiirellä suun kautta nautittuna sikiöveteen. Jimenezin ym. (2005) mukaan on todennäköistä, ettei täysiaikainen sikiö ole steriili, vaan bakteerien kolonisaatio alkaa jo ennen syntymää.

5.1 Ensimmäiset elinviikot

Ensimmäisinä elinpäivinä syntymätapa ja ympäristö vaikuttavat eniten vauvan suoliston bakteerilajistoon. Hollantilaistutkimuksessa keisarinleikkauksella syntyneillä oli vähemmän bifidobakteereita ja *Bacteroides*-sukuisia bakteereita kuin alateitse syntyneillä (Penders ym. 2006). Lisäksi keskoisuus, sairaalassaolo ja antibioottikuurit vaikuttivat merkittävästi bakteerilajistoon.

Vauvan suoliston bakteerilajisto muuttuu ensimmäisinä elinpäivinä nopeasti. Bakteereita alkaa erittyä muutaman tunnin kuluttua syntymästä ulosteeseen. Ensin suolisto kolonisoituu fakultatiivisilla aerobeilla. Kun nämä ovat kuluttaneet hapen, nousevat valtalajeiksi ehdottomat anaerobit.

Hyvin pian syntymän jälkeen ravinnosta tulee keskeisin suolistomikrobiston koostumukseen vaikuttava tekijä. Harmsenin ym. (2000) mukaan äidinmaidon bifidobakteerien kasvua suosivat oligosakkaridit vaikuttavat voimakkaasti vauvan suoliston lajistoon verrattuna korvikeruokittuihin. Vaikutusta voi olla myös rintaruokittujen vauvojen tyypillisesti matalammalla ulosteen pH:lla.

Harmsenin ym. (2000) tutkimuksessa rintaruokituilla vauvoilla (n = 6) esiintyi 20 ensimmäisenä elinpäivänään ulosteessa pääasiallisesti bifidobakteereita. Bifidobakteereista tuli valtalaji (>60 % kaikista bakteereista) viikon sisällä syntymästä, mikäli vauva sai yksinomaan rintamaitoa. Korvikeruokituilla vauvoilla (n = 6) esiintyi ulosteessa yhtä paljon *Bacteroides*-sukuisia bakteereita kuin bifidobakteereita, sekä lisäksi enemmän klostrideja, stafylokokkeja ja kolibakteereita.

Rintaruokituilla oli Harmsenin ym. (2000) mukaan bifidobakteerien lisäksi huomattava määrä streptokokkeja, kuten *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus agalactiae* ja *Streptococcus salivarius*, ja laktobasilleja, kuten *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum* ja *Lactobacillus fermentum*. Lisäksi FISH-menetelmä paljasti, että maidossa esiintyi myös runsaasti ei-viljeltävissä olevia *Bacteroides*-sukuisia lajeja.

5.2 Suolistomikrobisto kuukauden iässä

Pendersin ym. (2006) laajassa tutkimuksessa (n = 1032) kuukauden ikäisten rintaruokittujen vauvojen ulosteista määritetty suolistobakteeristo koostui pääosin bifidobakteereista. Korvikeruokituilla oli merkittävästi enemmän *Escherichia coli*-, *Clostridium difficile*-, *Bacteroides*-sukuisia bakteereita ja laktobasilleja. Laktobasillien suurempi määrä korvikeruokituilla johtui luultavasti hollantilaisiin korvikkeisiin yleisesti lisätyistä prebioottisista oligosakkarideista, joiden tiedetään lisäävän maitohappobakteerien ja bifidobakteerien määrää suolistossa.

Pendersin ym. (2006) tutkimuksessa vertailtiin 1032 vauvan suolistomikrobistoa ja tutkittiin muun muassa synnytystavan (sektio tai alatiesynnytys), ruokinnan (rintaruokinta tai korvike), synnytyspaikan (sairaala tai koti) ja antibiootihoidon vaikutusta lajistoon. Kuukauden iässä suotuisin suolistomikrobisto, eli eniten bifidobakteereita ja vähiten *Clostridium difficile*- ja *Escherichia coli* -kantoja, oli alateitse kotona syntyneillä rintaruokituilla vauvoilla.

5.3 Vieroituksen jälkeen

Kirjavaisen ym. (2001) mukaan imetyksen loppumisen jälkeen bifidobakteerien määrä suolistossa putoaa. Vieroitus alentaa myös bakteerien kokonaismäärää. Kun vauva alkaa syödä samaa ravintoa kuin aikuiset, myös bakteerikoostumus alkaa muistuttaa aikuisen suoliston bakteerikoostumusta.

Aikuisen suolistossa on huomattava määrä bakteereita, noin kilon verran. Lajeja on enemmän kuin tuhat (Zoetendal ym. 2006). Tunnettuja bakteerilajeja ovat anaerobiset bakteerit: bifidobakteerit, eubakteerit, laktobasillit, anaerobiset kokit ja bakteroidit. Näiden valtalajien lisäksi suolistossa esiintyy pienemmissä määrin fakultatiivisesti aerobisia lajeja, kuten enterobakteereita, stafylokokkeja, streptokokkeja, enterokokkeja, klostrideja ja hiivoja. Suolistobakteeristo vaihtelee aikuisiässä yksilöllisesti johtuen mm. ravitsemuksellisista, maantieteellisistä ja hygieenisistä eroista (Mikelsaar ym. 2003).

Aikuisen suolistossa on lisäksi runsaasti bakteereita, joita ei vielä ole kyetty tunnistamaan tai joita on tutkittu vasta vähän. Tämä johtuu siitä, että aikuisen suoliston bakteereista pääosa on

ehdottoman anaerobisia, ja yli puolet sellaisia, joita ei pystytä kasvattamaan laboratorio-oloissa (Tlaskalova-Hogenova ym. 2004).

6 Bakteriosiinit

Bakteriosiinit ovat pieniä (yleensä 30 – 60 aminohappoa) polypeptidejä, joiden avulla bakteerit estävät muiden, kilpailevien bakteerien kasvua. Niitä on kutsuttu myös peptidiantibiooteiksi tai antimikrobisiksi peptideiksi. Osa tutkijoista kuitenkin haluaa välttää antibiootti-sanaa, sillä bakteriosiineja käytetään elintarvikkeissa säilöntäaineena. Lisäksi, toisin kuin klassiset peptidiantibiootit, esimerkiksi gramisidiinit ja polyketiinit, bakteriosiinit tuotetaan ribosomaalisesti, eikä erillisten entsyymikompleksien avulla (Katsaus: Jack ja Jung, 2000).

Ensimmäiseksi bakteriosiineista kuvattiin gram-negatiivisen *Escherichia coli* V:n tuottama kolisiini. Se löydettiin dialysoitavana, kuumakestoisena antimikrobisena yhdisteenä jo vuonna 1925. Yleinen termi "bakteriosiini" määritettiin vuonna 1953 kolisiinin tyyppisenä proteiiniantibioottina, jolla oli antimikrobisia ominaisuuksia ja kyky kiinnittyä solun pinnan reseptoriin (Historiakatsaus: Jack ym., 1995).

Nykyisin tiedetään, että bakteriosiineja tuottavat hyvin monet erilaiset bakteerit, ehkä jopa suurin osa bakteereista (Jenssen ym., 2006). Tutkimukset ovat kuitenkin voimakkaasti keskittyneet gram-positiivisten bakteerien, erityisesti maitohappobakteerien, tuottamiin bakteriosiineihin. Maitohappobakteereita pidetään yleisesti turvallisina, ja niitä voidaan sen vuoksi käyttää elintarviketeollisuudessa ja probiootteina. *Lactococcus lactis* -bakteerin tuottamaa nisiini-bakteriosiinia käytetään säilöntäaineena (E234) elintarvikkeissa yli 50 maassa (Delves-Broughton ym., 1996).

Bakteriosiinit tehoavat yleensä vain tuottajalle itselleen läheistä sukua oleviin lajeihin. Esimerkiksi gram-positiivisten bakteerien tuottamat bakteriosiinit tappavat yleensä vain muita gram-positiivisia bakteereita. Tämä on ymmärrettävää, sillä sukulaislajit luultavasti kilpailevat samasta ekologisesta lokerosta, ruoasta ja tilasta, keskenään. Toisinaan inhibitiokyky on erittäin suppea, ja bakteriosiini tappaa vain saman lajin eri kantoja tai vain läheistä sukua olevia saman bakteeriperheen jäseniä.

Bakteriosiinigenit ovat yleensä plasmideissa, mutta ne voivat olla myös kromosomissa. Usein niiden tuottoon tarvitaan useita geenejä, joiden koodaamat proteiinit osallistuvat translaation jälkeisiin muutoksiin, translokaatioon eli kuljettamiseen solun ulkopuolelle, transkription säätelyyn ja itseimmunitettiin (Katsaus: Jack ym., 1995). Esimerkiksi biologisesti aktiivisen nisiinin tuottoon vaaditaan 11 geeniä (nisA/Z/QBTCIPRK ja nisFEG).

6.1 Bakteriosiinien luokittelu

Bakteriosiineja tunnetaan yli sata erilaista, ja määrä kasvaa jatkuvasti (taulukko I.8). Ne jaotellaan nykyisin neljään eri luokkaan: lantibiootit, muokkaamattomat peptidit, isot proteiinit ja sykliset peptidit (kuva I.8).

I Lantibiootit

Ia Lineaariset
Ib Globulaariset
Ic Moniosaiset

II Muokkaamattomat peptidit

IIa Pediosiinin tyypiset
IIb Sekalaiset
IIc Moniosaiset

III Isot proteiinit

IIIa Bakteriolyttiset
IIIb Ei-lyttiset

IV Sykliset peptidit

Kuva I.8 Bakteriosiinien luokittelu Cotterin ym. (2005, 2006) mukaan.

Ensimmäiseen luokkaan, lantibiootteihin, kuuluu pieniä, lämpökestoisia peptidejä (19 - 38 aa), joilla on tyypillisesti lantioniinirenkaita rakenteessaan. Tällaisia ovat esimerkiksi nisiini, mersasiidiini ja laktisiini 481.

Toinen luokka sisältää pieniä (<10 kDa) lämpökestoisia peptidejä, joita ei, toisin kuin lantibiootteja, juuri muokata translaation jälkeen. Ryhmään kuuluu sekalainen joukko pieniä peptidejä, joista osa on “*Listeria*-aktiivisia”, kuten pediosiini ja leukosiini A.

Kolmas luokka sisältää isoja bakteriosiineja, kuten lysostafiini ja enterolysiini A. Neljäs puolestaan syklisiä, translaation jälkeen muokattavia peptidejä, kuten enterosiini AS48 ja mikrosiini J25.

Taulukko I.8 Tunnettuja bakteriosiineja. Tiedot kerätty artikkeleista: Pag ja Sahl (2002), Ennahar ym. (2000), Sahl & Bierbaum (1998), Jack ym. (1995), Guinane ym. (2005), Kawai ym. (2004), Kemperman ym. (2003), Wirawan ym. (2006), Zendo ym. (2003).

<u>Bakteriosiini</u>	<u>Tuottava bakteerilaji</u>	<u>Molekyylipaino (Da)</u>
<u>Luokka I: Lantibiootit</u>		
Nisiini A/Z/Q	<i>Lactococcus lactis</i>	3352/3330/3327
Nisiini U	<i>Streptococcus uberis</i>	3172
Subtiliini	<i>Bacillus subtilis</i>	3317
Epidermiini	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2164

Bakteriosiini	Tuottava bakteerilaji	Molekyylipaino (Da)
Gallidermiini	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2164
(Val1, Leu6)-epidermiini	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2151
Stafylokokkiini T	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2166
Mutasiini B-Ny266/1140/I/III	<i>Streptococcus mutans</i>	2270/2263/2364/2266
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3488
Episidiini 280	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3133
Epilansiini K7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3032
Laktosiini S	<i>Lactobacillus sake</i>	3764
Streptokokkiini A-FF22	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2795
Laktisiini 481	<i>Lactococcus lactis</i>	2901
Salivarsiini A	<i>Streptococcus salivarius</i>	2315
(Lys2, Phe7)-Salivarsiini A	<i>Streptococcus salivarius</i>	2321
Variasiini	<i>Micrococcus varians</i>	2658
Kypemysiini	<i>Streptomyces</i> spp	2094
Plantarsiini C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2880
Kinnamysiini	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	2042
Duramysiini	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	2014
Duramysiini B	<i>Streptoverticillium</i> ssp	1951
Duramysiini C	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	2008
Ankoveniini	<i>Streptomyces</i> spp	1959
Mersasidiini	<i>Bacillus</i> ssp	1825
Aktagardiini	<i>Actinoplanes</i> ssp	1890
Kahdesta peptidistä muodostuvat lantibiootit:		
Sytolysiini L1/L2	<i>Enterococcus faecalis</i>	4164/2631
Mutasiini T8	<i>Streptococcus mutans</i>	3245
Karnosiini UI49	<i>Carnobacterium piscicola</i>	4635
<u>Luokka II: Muokkaamattomat peptidit</u>		
Leukosiini A	<i>Leuconostoc gelidum</i>	3390
Leukosiini B-Talla	<i>Leuconostoc carnosum</i>	3390
Mesenterisiini Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3868
Diversiini V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	4509
Carnobacteriocin B2/BM1	<i>Carnobacterium piscicola</i>	4967
Piskikosiini /Via/126	<i>Carnobacterium piscicola</i>	4416/4526/?
Mundtisiini	<i>Enterococcus mundtii</i>	4287
Enterosiini A/P	<i>Enterococcus faecium</i>	4829/4493
Pediosiini PA-1	<i>Pediococcus parvulus</i>	4623
Pediosiini AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4623
Kurvasiini A	<i>Lactobacillus curvatus</i>	?
Sakasiini A/P	<i>Lactobacillus sake</i>	4306/4434

Bakteriosiini	Tuottava bakteerilaji	Molekyylipaino (Da)
Bavarisiini A/MN	<i>Lactobacillus sake</i>	3500-4000/?
Laktokokkiini G	<i>Lactococcus lactis</i>	?
Laktasiini F	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	?
<u>Luokka III: Isot proteiinit</u>		
Helvetisiini J/V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	37 511/?
Asidofilusiini A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	?
Laktasiini B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	?
Enterolysiini A	<i>Enterococcus faecalis</i>	35 000
Termofiiliini ST-1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	?
Linosiini M18	<i>Brevibacterium linens</i>	31 000
<u>Luokka IV: Sykliset peptidit</u>		
Enterosiini AS48	<i>Enterococcus faecalis</i>	7149
Mikrosiini J25	<i>Escherichia coli</i>	2107
Reuteriini 6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	?
Gasseriini A	<i>Lactobacillus gasseri</i>	?
Sirkulariini A	<i>Clostridium beijerinckii</i>	?
Klostisiini 574	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	?

6.2 Toimintatapa

Suurin osa bakteriosiineista tappaa vaikuttamalla solukalvon läpäisyvyyteen tai solun entsyymitoimintaan. Monien vaikutusmekanismi on kuitenkin vielä selvittämättä.

Ryhmän I bakteriosiineista, lantibiooteista, nisiinin vaikutusmekanismia on tutkittu eniten. Sen tiedetään tuhoavan soluja sitoutumalla solukalvoon kiinnittyneisiin lipidiII-molekyyleihin, joita tarvitaan soluseinän rakentamisessa. Nisiinin vaikutuksesta peptidoglykaanin synteesi estyy ja solukalvoon muodostuu reikiä. Globulaariset lantibiootit, kuten mersasidiini, puolestaan estävät entsyymien toimintaa (Katsaus: Cotter ym. 2005).

Ryhmän II bakteriosiinit muuttavat solukalvon läpäisevyyttä ja aiheuttavat hallitsematonta molekyylien vuotamista bakteerisolusta. Mahdollinen kohdemolekyyli pediosiinin tyyppisillä bakteriosiineilla on mannoosipermeaasi. Kahdesta peptidistä koostuvat bakteriosiinit tarvitsevat toimiakseen kumpaakin peptidiä. Myös ne vaikuttavat solukalvon läpäisevyyteen, mutta mekanismia ei kunnolla tunneta (Cotter ym., 2005).

Ryhmän III isot bakteriosiinit toimivat muista bakteriosiineista poikkeavasti. Ne saavat aikaan soluseinän hydrolyysiä ja aiheuttavat sillä tavoin solujen hajoamisen (Cotter ym., 2005).

Ryhmän IV sykliset peptidit toimivat useilla tavoilla: esimerkiksi enterosiini AS-48 poraa reiän solukalvoon ja mikrosiini J25 häiritsee solun jakautumista (Trabi ja Craik, 2002).

6.3 Käyttö elintarvikkeissa ja lääkeaineina

Bakteriosiineja on löydetty ja kuvattu paljon, mutta vain osaa on testattu niiden mahdollista käyttöä varten elintarvikkeissa tai lääkkeinä. Yhä edelleen nisiini on ainoa elintarvikkeiden lisäaineeksi hyväksytty bakteriosiini (E234), jota hyödynnetään lähinnä juustoissa, säilykevihanneksissa, pastöroiduissa hapanmaitotuotteissa, nestemäisissä munavalmisteissa ja salaattinkastikkeissa. Sen avulla torjutaan erityisesti listeriaa ja klostrideja. Se on hyväksytty käyttöön yli 50 maassa (Delves-Broughton ym., 1996).

Elintarvikekäyttöä varten tutkittuja bakteriosiineja ovat, nisiinin ohella, muun muassa pediosiini PA-1 ja laktisiini 3147. Pediosiini PA-1 on jo patentoitu elintarvikkeiden lisäaineena Amerikassa ja Euroopassa. Sitä sisältävä fermentointituote AltaTM on kaupallisesti saatavilla, ja sitä käytetään estämään erityisesti *Listeria monocytogenes* -bakteerin kasvua valmiissa liharuuissa. Laktisiini 3147:lle etsitään käyttöä vähemmän happamissa ruoissa, sillä se säilyttää niissä aktiivisuutensa paremmin kuin nisiini (Chen ja Hoover, 2003).

Puhdistettujen bakteriosiinien lisäksi itse tuottajakantoja on pyritty käyttämään suojaviljelminä ruoissa. Esimerkiksi bakteriosiinia tuottavia *Lactobacillus sake*-, *Lb. bavaricus*-, *Pediococcus acidilactici*-, *Staphylococcus xylosus*-, *Lactobacillus plantarum* -bakteerikantoja on käytetty lihatuotteissa ja makkaroidissa (Katsaus: Chen ja Hoover, 2003).

Lääkekäyttöä bakteriosiineille on kaavailtu muun muassa antibiooteille resistenttien bakteerien, kuten metisilliinille resistenttien *Staphylococcus aureus* -kantojen (MRSA) ja vankomysiinille resistenttien enterokokkien (VRE) tuhoamiseksi (Katsaus: Pag ja Sahl, 2002). Lupaavimmat terapeuttiset sovellukset liittyvät mersasidiinin, aktagardiinin ja mutasiinin käyttöön. Mersasidiinin on havaittu eläinkokeissa sekä parantavan systeemisiä MRSA-infektioita että estävän bakteerin kolonisoitumista nenään (Kruszewska ym., 2004). Mutasiinin on todettu estävän vatsakalvon kautta annettuna hiirillä MRSA-bakteeria, sekä patogeenisiä *E. coli*- ja enterokokkikantoja (Mota-Meira ym. 2005). Kliiniset eli ihmisillä saadut tulokset kuitenkin vielä puuttuvat.

Bakteriosiineille on suunniteltu monia muitakin lääketieteellisiä sovelluksia. Tutkimukset ovat kuitenkin vasta alkuvaiheessa ja kliiniset kokeet vielä tekemättä. Muun muassa nisiiniä kaavaillaan vatsahaavojen hoitoon, sillä se estää *Helicobacteri pylori* -infektioita. Epidermiini, ja sen variantti gallidermiini, ovat puolestaan tehokkaita estämään *Propionibacterium acnes* -bakteeria, joten niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää aknen hoidossa (Pag ja Sahl, 2002). Pep5:n ja epidermiinin on puolestaan todettu estävän *Staphylococcus epidermidis* -bakteerin kiinnittymistä katetreihin, joten niille toivotaan käyttöä sairaaloissa hyvin yleisten katetritulehdusten estossa (Fontana ym., 2006).

Sovelluksia etsitään myös eläinlääkintään. Esimerkiksi lehmien utaretulehdusten estämiseksi on tehty laktisiini 3147 -bakteriosiinia sisältävä umpituubi, jonka on todettu torjuvan *Streptococcus dysgalactiae*- ja *Staph. aureus* -bakteerien aiheuttamia utaretulehduksia (Crispie ym., 2005). Lisäksi markkinoilla on utareen puhdistukseen tarkoitettuja nisiiniä sisältäviä vedinpyyhkeitä ja –kastoja, joiden on todettu ärsyttävän vähemmän ihoa kuin esimerkiksi jodipitoisten puhdistusliuosten (Sears ym. 1992).

Bakteriosiineja tuottavia bakteerikantoja on tuotu markkinoille myös rohdosvalmisteina, ravinnelisinä. Muun muassa Uudessa-Seelannissa on markkinoilla *Streptococcus salivarius* K12 -valmiste, joka on suunnattu estämään nielutulehduksia ja poistamaan pahanhajuista hengitystä. Sitä on myyty jo viiden vuoden ajan, yhteensä noin 150 000 annosta (Burton ym., 2006). Kyseisen kannan on todettu tuottavan kahta lantibioottia: salivarisiini A:ta ja B:tä (Tagg, 2004).

Probioottisia maitohappobakteerivalmisteita on ravintolisinä tai luontaistuotteina runsaasti markkinoilla, mutta useimmista ei tiedetä, tuottavatko ne bakteriosiinia. Suomessa on myynnissä probioottikapseleita, kuten GEFILUS (*Lactobacillus rhamnosus* GG), RELA (*Lactobacillus reuteri*) BIOPHILUS (*Lb. rhamnosus* LCR35), BIFOLAC (*Lb. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*), TREVIS (*Lb. acidophilus*, *B. lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Str. thermophilus*), PANACIDO (*Ent. faecium* SF68) ja IDIOFORM (*Ent. faecium* SF68, *B. longum* Bb-46). Lisäksi tarjolla on SYMBIOFLOR I -tippoja (*Ent. faecalis* -autolysaatti) ja LACTOPHILUS-jauhetta (*Lb. rhamnosus* Lcr35). Osa tuotteista myydään ravintolisinä, osa rohdosvalmisteina. Yksi valmiste on rekisteröity lääkkeeksi (Lactophilus). Myös emättimen bakteeritulehduksiin on probioottivalmisteita, kuten emätinpuikkoja GYNOPHILUS (*Lb. rhamnosus* Lcr35) ja VIVAG (*Lb. acidophilus*).

Edellä mainituista probiooteista *Lb. rhamnosus* GG -bakteerin tiedetään tuottavan pienimolekyyllisiä, lämmönkestäviä antimikrobisia yhdisteitä (Silva ym., 1987). Myös monien muiden kaupallisten probioottien tiedetään tuottavan antimikrobisia yhdisteitä, mutta ne ovat vielä pitkälti karakterisoimatta (Katsaus: Servin, 2004).

Myös äidinmaidosta on löydetty bakteriosiinintuottajia, nisiiniä tuottavia *Lactococcus lactis* -kantoja (Tämä tutkimus, Beasley ja Saris 2004). Koska nämä estävät tehokkaasti muun muassa *Staphylococcus aureus* -bakteeria, niillä voisi olla käyttöä rintatulehdusten ja vauvojen suolistotulehdusten estossa.

II Kokeellisen tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää äidinmaidon bakteerien lajikoostumusta, bakteerien kykyä estää taudinaiheuttajia, sekä etsiä äidinmaidosta bakteriosiineja tuottavia bakteerikantoja. Yksityiskohtaiset tutkimustavoitteet olivat:

1. Selvittää terveiden äitien rintamaidon anaerobinen ja fakultatiivisesti anaerobinen bakteerikoostumus, erityisesti maitohappobakteerien esiintyminen, eristäen maljoilta pesäkkeitä satunnaisotannalla ja käyttäen molekyylibiologisia tunnistusmenetelmiä.
2. Tutkia miten yleisesti äidinmaidosta anaerobisesti kasvaneet bakteeripesäkkeet kykenevät estämään *Staphylococcus aureus* -bakteerin kasvua, sekä miten suuri osa satunnaisotannalla eristetyistä isolaateista, ja mitkä lajit, estävät kyseisen bakteerin kasvua puhtasviljelmänä.
3. Etsiä äidinmaidosta *Staph. aureus*-, *Listeria innocua*- ja *Micrococcus luteus* -bakteerien kasvua estäviä bakteerikantoja, ja tutkia tuottavatko ne bakteriosiineja. Karakterisoida löydettyjen bakteerikantojen tuottamia antibakteerisia yhdisteitä.

III Materiaalit ja menetelmät

1 Näytteet

Tässä tutkimuksessa analysoidut äidinmaitonäytteet (n = 141) saatiin kahden neuvolan Kauhavan neuvola ja Helsingin Itäkeskuksen neuvola sekä Imetyksen tuki ry:n tapaamisten, HYKSin äidinmaitokeskuksen ja yksityishenkilöiden kautta. Näytteet säilytettiin tarvittaessa -20 °C:ssa pakastimessa ennen viljelyä.

Näytteitä antavia äitejä kehoitettiin pesemään rinta ennen näytteenottoa ja näytteet kerättiin tämän jälkeen joko käsin lypsämällä tai steriilillä rintapumpulla. Näytemäärät olivat yleensä 1–2 millilitraa.

2 Bakteerikannat

Äidinmaiton bakteeridiversiteetin määrittämistä varten näytteistä (n = 40) eristettiin satunnaispesäkkeitä (n = 509) MRS-maljalta kuten on kuvattu artikkelissa (I).

Testiorganismien kasvua estäviä bakteereita, potentiaalisia bakteriosiinintuottajia, etsittiin kaikista saaduista äidinmaitonäytteistä (n = 141). Tätä varten 100 µl maitonäytettä levitettiin MRS-agarmaljalle (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA), kasvatettiin 48 tuntia anaerobisesti (Anaerocult A, Merck KgaA, Darmstadt, Saksa) 37°C:ssa, ja valettiin päälle 5 ml LB-kasvualustaa (Luria Bertani), johon oli ympätty 0,2 ml yön yli kasvanutta *M. luteus* ATCC 10240, *S. aureus* ATCC 12600 tai *Listeria innocua* ATCC 51742 -bakteeriviljelmää. Mikäli maljalla näkyi kasvatusten jälkeen selvästi testiorganismien kasvua inhiboivia pesäkkeitä, ne poimittiin ja puhdistettiin siirrostamalla 0,1 % (w/v) glukoosia sisältävälle M17-maljalle (= M17G) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Englanti) tai MRS-maljalle (Oxoid Ltd., Basingstoke, Englanti). Puhdistuksen jälkeen isolaatit säilöttiin ja tunnistettiin 16S rRNA -sekvensoinnilla, kuten on kuvattu artikkelissa (I).

Laktobasilleja eristettiin käyttämällä selektiivistä LBS-kasvualustaa (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA). Maitonäytettä levitettiin 100 µl LBS-agarmaljalle ja kasvatettiin 48 tuntia anaerobisesti 37°C:ssa. Maljoilta eristettiin kaikki pesäkkeet puhtasviljelmiksi MRS-maljoille.

Kaikki bakteeri-isolaatit säilöttiin -70°C:ssa kyseisille kannoille sopivissa kasvualustoissa, joihin oli lisätty 30 % (v/v) steriiliä glyserolia (Merck KgaA, Darmstadt, Saksa).

Taulukossa III.1 on lueteltu tutkimuksessa käytetyt vertailukannat. Vertailukannat saatiin Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksen mikrobiologian osaston HAMBI-kantakokoelmasta

(Helsingin yliopisto), National Collection of Industrial and Marine Bacteria -kantakokoelmasta (Aberdeen, Englanti), Christian Hansenin laboratoriosta (Tanska) ja Valiolta.

Taulukko III.1 Tutkimuksessa käytetyt vertailukannat.

Bakteerikanta	Lähde	ATCC-numero
<i>Lactobacillus curvatus</i> SAA263	Christian Hansen, Tanska	
<i>Lactobacillus plantarum</i> SAA260	Christian Hansen, Tanska	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio	
<i>Lactococcus lactis</i> LAC280	Beasley ja Saris (2004)	
<i>Lactococcus lactis</i> N8	Valio	
<i>Listeria innocua</i> H 2316	Hambi	51742
<i>Micrococcus luteus</i> SAA5	AL NCIMB 8166	10240
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> H 66	Hambi	12600

3 Bakteerien tunnistaminen

Äidinmaidosta eristetyt bakteerikannat tunnistettiin 16S rRNA -geenin osittaisella sekvensoinnilla tai stafylokokit *gap*-RFLP-menetelmällä kuten on tarkemmin kuvattu artikkelissa (I).

4 Antimikrobisen aktiivisuuden mittaaminen

4.1 Kerrosagarmenetelmä

Äidinmaidon bakteeripesäkkeiden antimikrobista aktiivisuutta mitattiin kerrosagarmenetelmällä kuten on kuvattu artikkelissa (I).

4.2 Täpläkokeet

Äidinmaidosta eristettyjen ja tunnistettujen kantojen antimikrobista aktiivisuutta testattiin täpläkokeella kuten on kuvattu artikkelissa (I). Siinä testattavan kannan yön yli kasvanutta viljelmää siirrostettiin 1–2 µl:n täplä MRS- tai M17G-maljalle, annettiin kasvaa yön yli, ja valettiin päälle testiorganismi (*S. aureus* ATCC 12600 tai *M. luteus* ATCC 10240) kuten edellä. Inhibitio tarkastettiin vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

Täpläkokeen toisessa versiossa sekoitettiin 200 µl yön yli kasvanutta tai glyseroliin säilöttyä *M. luteus* (ATCC 10240) -viljelmää yhteen millilitraan steriiliä tislattua vettä. Seos levitettiin tasaisesti LB-agarmaljalle kallistelemalla maljaa puolelta toiselle. Ylimääräinen neste pipetoitiin varovasti reunan kautta pois ja maljan annettiin kuivahtaa laminaarivirtauskaapissa. Tämän jälkeen pipetoitiin testattavaa bakteeriviljelmää 1–3 µl maljalle ja annettiin täplän kuivaa. Maljoja inkuboitiin yön yli 30°C:ssa ja sitten tarkasteltiin inhibitiota.

4.3 Kuoppakoe

Antimikrobista aktiivisuutta mitattiin pastöroiduista kasvuliemistä kuoppakokeella. Siinä levitettiin testiorganismi (*M. luteus* ATCC 10240) ensin LB-maljalle kuten täpläkokeessakin, ja annettiin maljan kuivaa. Tämän jälkeen maljalle tehtiin steriilien pipetinkärkien (200 µl:n kärki) isomman pään avulla kuopat, joihin pipetoitiin maksimissaan 2 x 50 µl (välillä kuivatus) pastöroitua (80 °C 10 min) kasvuliemisupernatanttia.

5 Proteinaasi- ja katalaasikäsittelyt

Proteinaasi K- ja trypsiinikäsittelyillä pyrittiin saamaan selville, onko kasvuliemessä mahdollisesti inhibitiota aiheuttava yhdiste proteiini tai peptidi eli hajoaako se proteinaasikäsittelyssä.

Entsyymikäsittelyjä varten kasvuliemisupernatantit pastöroitiin. Tämän jälkeen 200 µl:aan supernatanttia lisättiin joko a) 10 µl proteinaasi K:ta (20 mg/ml valmis liuos, Finnzymes), b) 4 µl trypsiiniä (50 mg/ml vesiliuos, Sigma) tai c) 2 µl katalaasia (50 mg/ml vesiliuos, Sigma) ja sitten inkuboitiin 37°C:ssa 4 tuntia. Inhibitio testattiin tämän jälkeen alkuperäisestä ja proteinaasikäsittelystä liuksesta kuoppakokeella.

6 Nisiinintuoton määrittäminen

Äidinmaidosta eristettyjen *L. lactis* -kantojen kykyä tuottaa nisiiniä mitattiin vihreäfluoresoivien proteiinien mittaamiseen perustuvalla biomenetelmällä (Reunanen & Saris, 2003) kuten on kuvattu artikkelissa (I).

7 Bakteriosiinien väkevöinti

Bakteriosiineja väkevöitiin niiden puhdistamista ja karakterisoimista varten kasvuliemestä kolmella erilaisella menetelmällä: ammoniumsulfaattisaostuksella, C18-kiinteäfaasiuutolla ja resiinillä (StrataClean).

7.1 Ammoniumsulfaattisaostus

Ammoniumsulfaattisuolasaostus perustuu siihen, että suola riistää vesimolekyylit proteiineilta, jolloin niiden hydrofobiset alueet paljastuvat ja tarttuvat toisiinsa. Tällöin muodostuu proteiinisakka, johon proteiinit saostuvat hydrofobisuutensa mukaisessa järjestyksessä ammoniumsulfaattimäärän kasvaessa.

Tässä tutkimuksessa ammoniumsulfaattisaostukset tehtiin 0 °C jäävesihauteessa käyttäen hyväksi kirjan Data for Biochemical Research (Dawson ym. 1969) taulukkoa. Tutkittavaa äidinmaidosta eristettyä *Str. peroris* MH 201 -kanta kasvatettiin 50 ml:ssa M17G-kasvulientä yön yli 30 °C:ssa. Tämän jälkeen kasvuliemi sentrifugoitiin (SA-600, 11 000 rpm, 15 min), supernatantti otettiin talteen, ja jäädytettiin jäävesihauteessa (0 °C). 35 ml:aan kasvulientä lisättiin 13,9 g ammoniumsulfaattia (= 65 % saostus) tunnin kuluessa pieninä määrinä kerrallaan ja lasisauvalla hyvin sekoittaen. Tämän jälkeen seoksen annettiin vielä seistä tunnin verran jäävesihauteessa välillä sekoittaen. Vertailukannoille *Lb. curvatus* SAA263 ja *Lb. plantarum* SAA260 65 % -saostukset tehtiin vastaavasti, mutta kasvulientä oli 7,5 ml, ja siihen lisättiin 3 g ammoniumsulfaattia. Pelkät kasvuliemet M17G ja MRS saostettiin vastaavalla tavalla. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin (4°C, SA600 14 000 rpm, 20 min) ja proteiinisakat liuotettiin noin 300 µl:aan steriiliä tislattua vettä.

7.2 C-18-kiinteäfaasiuutto

C-18-kiinteäfaasiuutto perustuu proteiinien tarttumiseen kiinteään, pylvääseen pakattuun polymeerifaasiin. Proteiinit tarttuvat pylvään hydrofobisiin hiiliketjuihin ja ne voidaan eluoida orgaanisella liuottimella, kuten metanolilla ja asetonitriilillä.

Äidinmaidosta eristettyjen *Staph. epidermidis* MH7- ja *Ent. faecalis* -kantojen kasvuliemistä, sekä nisiiniä tuottavan *L. lactis* LAC280 -referenssikannan kasvuliemistä eristettiin proteiineja StrataX-pylväällä (Strata III SP C18, 1 g/12 ml, Phenomenex). Pylväs laitettiin vesi-imuun ja huuhdeltiin ensin 10 ml:lla steriiliä tislattua vettä. Sitten sen läpi laitettiin vähitellen lisäten tutkittavaa kasvuliemisupernatanttia yhteensä 15 ml. Lopuksi pylväs pestiin 10 ml:lla tislattua vettä ja eluoitiin proteiinit pylvästä 6 ml:lla 100 % metanolia.

7.3 Väkevöinti hartsiin

Bakteriosiinit väkevöitiin kasvuliemisupernatantista trisiini-SDS-PAGE-geeliä varten StrataClean-hartsilla (Stratagene) valmistajan ohjetta mukaillen. Hartsin sitoo tehokkaasti proteiineja ja muodostaa huokoisen piidioksidin eli silikan kanssa liukenemattoman sakan. Proteiinit saadaan erotettua hartsista elektroforeesissa.

Tätä varten 2 ml kasvuliemisupernatanttia ja 30 µl StrataClean-resiiniä sekoitettiin hyvin koeputkisekoittajalla. Seos sentrifugoitiin, supernatantti hylättiin ja joukkoon sekoitettiin jälleen 2 ml kasvuliemisupernatanttia. Lopuksi liuos taas sentrifugoitiin, supernatantti hylättiin ja sakkaan sekoitettiin 20 µl 2 x Laemmlipuskuria (Sambrook ym. 1989).

8 Trisiini-SDS-PAGE

Trisiini-SDS-PAGE (Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis) on proteiinigeelielektroforeesin muunnos, joka on tarkoitettu erityisesti pienten proteiinien erotteluun (Schägger & von Jagow, 1987). SDS-PAGE:ssa proteiinit denaturoidaan ja ne kulkevat negatiivisesti varautuneina geelielektroforeesissa kokonsa mukaisessa järjestyksessä, pienet proteiinit edellä. Glysiini-SDS-PAGE-menetelmällä alle 20 kDa proteiinit erottuvat heikosti ja vain osittain. Koska trisiinipohjainen menetelmä erottelee proteiineja välillä 1-100 kDa ja suurin osa bakteriosiineista on kooltaan 2-5 kDa, niiden erotteluun käytettiin trisiini-SDS-PAGE-menetelmää.

8.1 Näytteiden valmistus

Näytteet väkevöitiin kasvuliemisupernatantista geelielektroforeesia varten StrataClean-hartsilla kuten edellä kuvattiin. Ennen näytteiden pipetointia geeliin näytettä pidettiin kiehuvaan vesihauteeseen neljän minuutin ajan, sentrifugoitiin nopeasti ja noin 20 µl supernatanttia pipetoitiin välittömästi geeliin. Molekyylipainostandardi Rainbow low MW marker (GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, England) käsiteltiin kuten näyte ja sitä pipetoitiin 5 µl geeliin.

8.2 Geelin valmistus, ajo-olosuhteet ja värjäys

Trisiini-SDS-PAGE-geeli ja geelijaon tarvittavat puskurit valmistettiin kuten Schägger & Jagow (1987) kuvaavat. Bakteriosiinien erottelua varten tehtiin 16,5 % T, 6 % C -vahvuinen geeli. Geeliä ajettiin ensin 1,5 tuntia 30 V jännitteellä ja tämän jälkeen 1,5–3 tuntia 90 V jännitteellä.

Geeli värjättiin ajon jälkeen Coomassie-menetelmällä kuten Schägger & von Jagow (1987) kuvasivat. Värjäamisen jälkeen geeli huuhdeltiin runsaassa tislatussa vedessä ja jätettiin huuhtoutumaan yön yli inhibitiotestauksia varten.

Molekyylipainostandardina oli Rainbow low MW marker (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Englanti) ja vertailunäytteenä puhdistettu nisiini A (Aplin & Barrett Ltd., Beaminstor, Englanti).

8.3 Inhibitiotestaukset

Coomassie-värijätyn geelin bakteriosiinien inhibitio tutkittiin soveltamalla Yildirim & Johnsonin (1998) menetelmää. Steriilissä tislatussa vedessä huuhdeltu geeli asetettiin LB-maljalle ja päälle valettiin 15 ml LB-pehmytagaria (0,75 % agar), jossa oli 0,4 ml *M. luteus* -bakteerin yön yli kasvanutta viljelmää. Maljoja inkuboitiin 30°C:ssa yön yli ja tarkastettiin inhibitio. Positiivisena vertailunäytteenä käytettiin puhdistettua nisiiniä (Aplin & Barrett Ltd., Beaminister, Englanti).

9 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC

HPLC-menetelmässä proteiinit johdatetaan kromatografiapylvään läpi, jolloin ne erottuvat mm. hydrofobisuutensa sekä polaaristen/ionisten ominaisuuksiensa perusteella. Kromatografiapylväitä on erilaisia, mutta useimmissa niissä on silikapartikkeleihin (halkaisijaltaan tavallisimmin 5 µm) liittyneenä erilaisia faasiaineita, kuten C18, C8, C6 -hiiliketjuja, jotka sitovat hydrofobisia proteiineja. Mitä pidempi hiiliketju, sitä voimakkaammin hydrofobiset komponentit sitoutuvat kyseiseen pylvääseen. Liuottimina käytetään yleensä vesipohjaista liuotinta, johon on lisätty suoloja tai esimerkiksi trifluorietikkahappoa (TFA) parantamaan erotuskykyä, sekä erilaisia orgaanisia liuottimia (esim. metanoli, asetonitriili, isopropanoli).

Käänteisfaasikromatografiassa eli RP-HPLC:ssä, joka on nykyisin vallitseva menetelmä, käytetään yleensä lineaarista gradienttia orgaanisen liuottimen suhteen. Tällöin hydrofiiliset komponentit eluoituvat ensin ja hydrofobiset vasta korkeammassa orgaanisen liuottimen pitoisuudessa. Liuottimen, lisäaineiden ja gradientin valinnat vaativat usein optimointia. Tavoitteena on mahdollisimman terävät ja hyvin toisistaan erottuvat piikit kromatogrammissa.

Tässä tutkimuksessa kokeiltiin aluksi erilaisia HPLC-ajo-olosuhteita, pylväitä ja liuottimia käyttämällä näytteenä puhdasta nisiiniä (Aplin & Barrett Ltd., Beaminister, England) ja nisiiniä tuottavan *L. lactis* LAC280 -referenssikannan kasvulientä (ei kuvaa). Näiden tulosten perusteella HPLC-ajoihin valittiin virtaus 0,6 ml/min ja 20 minuutin lineaarinen 5–100 % isopropanoligradientti 0,05 % trifluorietikkahapossa. Pylväs oli Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) ja käytössä oli Agilent 1100 HPLC-laitteisto varustettuna diodirivi-ilmaisimella ja fraktionkeräimellä (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Ajo-ohjelma oli seuraava: 2,5 min kohdalla isopropanolipitoisuus 5 %, minkä jälkeen se nousi lineaarisesti ja oli 20 minuutin kohdalla 100 %. Tämän jälkeen ajo jatkui vielä 5 minuuttia (jälkiaika).

Bakteriosiinit detektoitiin 220 nm:n aallonpituudella, jolla peptidisidokset absorboivat voimakkaasti. Tätä aallonpituutta käytetään sellaisten peptidien detektoinnissa, jotka eivät sisällä aromaattisia sivuketjuja.

Aktiivisuuden toteamiseksi ja nisiinipiikin paikantamiseksi *L. lactis* LAC280 -referenssikannan HPLC-ajosta kerättiin 25 sekunnin fraktioita mikrotiitterilevylle. Fraktiot haihdutettiin HETO-vakuumisentrifugilla (Heto Lab Equipment, Allerød, Tanska) ja liuotettiin 10 µl:aan steriiliä tislattua vettä, jonka pH:ksi oli säädetty 2,5 suolahapon avulla. Tämän jälkeen fraktioiden inhibitiot testattiin täpläkokeella (1 µl) käyttäen *M. luteus* -bakteeria testiorganismina.

IV Tulokset

1 Äidinmaidon bakteeridiversiteetti

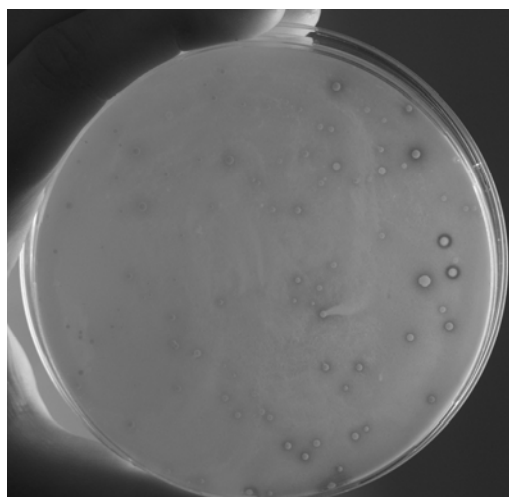
Äidinmaidon bakteeridiversiteetin selvittämiseksi viljeltiin 40 maitonäytettä, joista eristettiin satunnaisotannalla tunnistettaviksi 509 mikrobi-isolaattia, 10–21 isolaattia/näyte. Mediaani anaerobinen pesäkemäärä äidinmaitonäytteissä oli $5,6 \times 10^2$ pmy/ml, ja suurin osa pesäkemääristä oli välillä 1×10^2 ja 1×10^3 pmy/ml. Suurin osa bakteereista oli stafylokokkeja ja oraalisia streptokokkeja. Lisäksi osassa näytteistä esiintyi maitohappobakteereita ja enterokokkeja. Bakteerilajisto on esitetty artikkelin (I) taulukossa 1.

2 Bakteerien kyky estää *Staph. aureus* -bakteerin kasvua

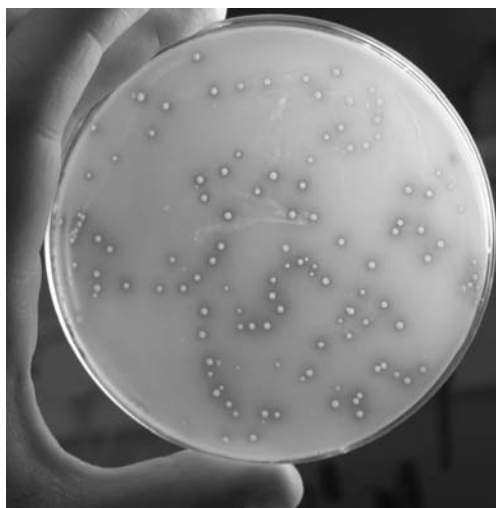
2.1 Pesäkeinhibitio

Tutkimuksessa selvitettiin, miten yleisesti äidinmaidosta viljelymaljalle kasvaneet pesäkkeet estivät tulehduksia aiheuttavan *Staph. aureus* -bakteerin kasvua. Tätä varten maitonäytteet (n = 40) viljeltiin anaerobisesti MRS-maljalle ja pesäkkeiden päälle valettiin *Staph. aureus* kanta ATCC 12600. Kasvatusten jälkeen maljoilta tarkasteltiin estokehien kokoa ja inhiboivien pesäkkeiden suhteellista osuutta (kuva IV.1). Artikkelin (I) kuvassa 1 on tarkemmin esitelty erilaiset inhibitiotyypit.

A)



B)



Kuva IV.1 Äidinmaidosta MRS-maljalle anaerobisesti kasvaneiden pesäkkeiden kyky estää *Staph. aureus* ATCC 12600 -bakteerin kasvua. Esimerkkejä maljoista: kuvassa A) näkyy sekä pesäkkeitä, joilla on heikko, diffuusi inhibitio että selvästi inhiboivia pesäkkeitä (kirkas inhibitiokehä). Kuvassa B) inhibitio pesäkkeiden ympärillä on diffuusia eli testiorganismien kasvu estynyt vain osittain. Erilaiset estokehät on esitelty tarkemmin artikkelin (I) kuvassa 1.

Tulokset äidinmaidon pesäkkeiden inhibitiosta on esitetty artikkelin (I) taulukossa 2. Estokehiä tuottaneita pesäkkeitä esiintyi äidinmaidossa yleisesti, 90 prosentissa näytteistä. Niiden osuus kokonaispesäkemäärästä ja inhibition voimakkuus vaihtelivat näytekohtaisesti. Keskimäärin 40 % pesäkkeistä inhiboi lievästi eli testiorganismien kasvu estyi vain osittain. Pesäkkeitä, jotka saivat aikaan kirkkaan estokehän ympärilleen, oli yleensä muutama prosentti. Näytekohtaiset erot olivat kuitenkin suuria. Joissain inhiboivia pesäkkeitä oli noin kymmenesosa kaikista pesäkkeistä, kun taas yhdessä näytteessä kaikki pesäkkeet inhiboivat.

2.2 Satunnaisotannan bakteeri-isolaattien inhibitiokyky

Äidinmaidosta satunnaisotannalla eristettyjen, ja molekyylibiologisin menetelmin tunnistettujen kantojen (n = 443) kykyä estää *Staph. aureus* -bakteerin kasvua tutkittiin täpläkokeella. Tulokset on esitetty artikkelin (I) taulukossa 3. Yhteensä yli neljännes eristetyistä kannoista esti *Staph. aureus* -bakteerin kasvua ja 7 % sai aikaan kirkkaan estokehän ympärilleen.

3 Laktobasillit

Äidinmaidosta (n = 141) löytyi laktobasilleja kun käytettiin selektiivistä LBS-kasvualustaa (taulukko IV.1). Kasvualusta toimi hyvin, eikä maljoille tullut muiden sukujen pesäkkeitä. Selektiivisinä tekijöinä kasvualustassa on ammoniumsitraattia ja natriumasetaattia. Lisäksi matala

pH 5,4 rajoittaa tiettyjen bakteerien kasvua. Laktobasilleja löydettiin LBS-maljalta kolmesta eri näytteestä yhteensä kuusi isolaattia.

Edellä kuvattujen LBS-maljalta eristettyjen lajien lisäksi satunnaisotannassa eristettiin viisi *Lb. rhamnosus* -isolaattia kahdesta eri näytteestä MRS-maljalta (artikkelin (I) taulukko 1) ja inhibition perusteella eristettiin kolme *Lb. rhamnosus* -isolaattia kahdesta eri näytteestä (taulukko IV.4).

Taulukko IV.1 Äidinmaitonäytteistä (n = 141) selektiivisellä kasvualustalla eristetyt ja 16S rRNA -sekvensoinnilla tunnistetut laktobasillit.

Näytekoodi	Lajitunnistus (kantojen lukumäärä)
PL1	<i>Lactobacillus</i> sp. (1), <i>Lactobacillus crispatus</i> (2)
Y81	<i>Lactobacillus gasseri</i> (1)
CAM	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (2)

Kuoppakokeessa kaikkien laktobasillikantojen pastöroidut MRS-kasvuliemet (50 – 100 µl/kuoppa) inhiboivat lievästi (diffuusi inhibitiokehä) *M. luteus* -bakteerin kasvua. LBS-liemessä kasvatuksen jälkeen kannat inhiboivat voimakkaammin, mutta ilmiö johtui luultavasti siitä, että myös pelkkä LBS-kasvuliemi heikensi hieman testibakteerin kasvua. Havaittu inhibitio MRS-maljalla johtui mahdollisesti happojen tai vetyperoksidin tuotosta, sillä proteinaasikäsittelyt (trypsiini, proteinaasi K) eivät vaikuttaneet inhibitioon. Proteinaasikäsittelyjen toimivuudesta ei kuitenkaan voi olla täysin varma, sillä kasvulienten pH:ta ei säädetty ennen käsittelyä. Toisaalta, vastaavasti käsitellyllä nisiiniä tuottavalla referenssikannalla proteinaasi K –käsittely esti inhibition.

Yhdeltä äideistä (näytekoodi CAM taulukossa IV.1), jonka rintamaidosta eristettiin *Lactobacillus rhamnosus* -kantoja, saatiin näyte myös vauvan ulosteesta. Vauva oli näyttenottohetkellä kuuden vuorokauden ikäinen ja söi yksinomaan rintamaitoa. Äiti kertoi nauttineensa kaupallista *Lb. rhamnosus* GG -maitohappobakteerivalmistetta (Valio) ja antaneensa sitä myös vauvalle äidinmaitoon sekoitettuna.

Vauvan ulosteessa oli laktobasilleja LBS-maljalla noin 5×10^6 pmy/ml. Äidinmaidossa oli vastaavasti noin 2×10^2 pmy/ml. Kummastakin näytteestä eristetyt isolaatit (2 kpl) tunnistettiin 16S rRNA -sekvensoinnissa *Lb. rhamnosus* -lajiin kuuluviksi. Äidinmaitokannat lähetettiin Valiolle, jossa ne osoittautuivat RAPD -menetelmällä identtisiksi *Lb. rhamnosus* GG -kannan kanssa.

4 Potentiaalisten bakteriosiintuottajien eristäminen

Tutkimuksessa pyrittiin eristämään äidinmaidosta muiden bakteerien kasvua estäviä bakteereita, mahdollisia bakteriosiintuottajia. Erityisesti oltiin kiinnostuneita maitohappobakteereista, joita voidaan helposti hyödyntää elintarvikkeissa ja lääkevalmisteissa, sillä niitä pidetään yleisesti turvallisina.

Tutkimuksessa etsittiin *M. luteus* ATCC 10240-, *S. aureus* ATCC 12600- ja *L. innocua* ATCC 51742 -bakteereja estäviä mikrobeja yhteensä 141:stä äidinmaitonäytteestä. Näitä kaikkia inhiboivia isolaatteja löytyi äidinmaitonäytteistä (taulukko IV.2). Yhteensä inhiboivia isolaatteja eristettiin 450. Niistä suurin osa (46 %, 206 isolaattia) eristettiin *Staphylococcus aureus* -bakteerin kasvun eston perusteella. *Listeria innocua* -bakteerin kasvua estävinä eristettiin 39 % (174) ja *Micrococcus luteus* -bakteerin kasvua estävinä 16 % (70) isolaateista.

Taulukko IV.2 Äidinmaidon isolaattien inhibition voimakkuus alkuperäisellä eristysmaljalla. Taulukon luvut ovat eristettyjen isolaattien määriä ja suluissa prosenttiosuus kaikista kyseistä testibakteeria vastaan inhiboivista isolaateista.

Testiorganismi	Inhibition voimakkuus			
	voimakas	kohtalainen	heikko	yhteensä
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	5 (7 %)	26 (37 %)	39 (56 %)	70
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	13 (6 %)	110 (53 %)	83 (40 %)	206
<i>L. innocua</i> ATCC 51742	9 (5 %)	78 (45 %)	87 (50 %)	174

Taulukossa IV.2 on esitetty isolaattien inhibition voimakkuus maljalla, josta ne alunperin eristettiin. Taulukossa ilmaistu "voimakas" inhibitio näkyi kirkkaana (≥ 1 mm) kehänä, "kohtalainen" inhibitio kirkkaana (< 1 mm) kehänä ja "heikko" inhibitio diffuusina kehänä pesäkkeen ympärillä. Inhibition voimakkuuden tarkka kuvaaminen oli kuitenkin vaikeaa, sillä pesäkkeiden koko, testiorganismin kasvun voimakkuus sekä inhibitiokehän kirkkaus ja selvärajaisuus vaihtelivat. Tämän vuoksi tuloksia inhibition voimakkuudesta voidaan pitää lähinnä suuntaa antavina.

4.1 Antibakteeristen pesäkkeiden yleisyys maitonäytteissä

Kaikkiaan 141:stä tutkitusta äidinmaitonäytteestä noin puolesta (71 näytettä) löytyi jotain käytettyä testibakteeria selkeästi inhiboivia pesäkkeitä. Muissa näytteissä ei ollut inhiboivia pesäkkeitä tai inhibitio oli erittäin diffuusia, heikkoa ja tulkinnanvaraista.

Yleisimmin löytyi *Staphylococcus aureus* -bakteeria inhiboivia isolaatteja. Kohtalaisesti tai lievästi kyseistä kantaa inhiboivia pesäkkeitä esiintyi 41 prosentissa ja voimakkaasti inhiboivia 5 prosentissa näytteitä. Noin kolmanneksessa maitonäytteitä esiintyi *Listeria innocua* ja kymmenesosassa *Micrococcus luteus* -aktiivisia isolaatteja. Kuten taulukosta IV.3 näkyy, voimakkaasti inhiboivia pesäkkeitä esiintyi harvemmin, muutamassa prosentissa näytteitä.

Taulukko IV.3 Testibakteerien kasvua inhiboivien pesäkkeiden esiintyvyyttä äidinmaitonäytteissä.

Testibakteeri	voimakas inhibitio	kohtalainen/heikko inhibitio
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	2 (1 %)	16 (11 %)
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	7 (5 %)	58 (41 %)
<i>L. innocua</i> ATCC 51742	3 (2 %)	47 (33 %)

4.2 Inhiboivien bakteerikantojen tunnistus

Inhiboivista bakteereista tunnistettiin 40 isolaattia 16S rRNA -sekvensoinnilla (taulukko IV.4). Tunnistukseen valittiin isolaatteja, jotka kasvoivat ja olivat edelleen selvästi inhibitiokykyisiä. Moni isolaatti menetti jatkosiirrostuksissa inhibitiokykynsä tai kuoli.

Jatkoviljelyvaiheessa inhiboivia kantoja tutkittiin mikroskooppisesti vaihevastakohta-valaistuksessa ja pyrittiin löytämään tunnistettavaksi ketjumaisina muodostelmina esiintyviä mahdollisia maitohappobakteereita. Suurin osa mikroskoopilla tarkastelluista isolaateista oli rypälemäisinä solukimppuina esiintyviä kokkeja, eli mahdollisia stafylokokkeja. Mikroskopoinnin ohella osalle isolaateista tehtiin katalaasitesti, sillä stafylokokit ovat katalaasiposiitivisia, ja maitohappobakteerit negatiivisia.

Isolaateista 75 (n = 450) lakkasi kasvamasta heti ensimmäisissä jatkoviljelyissä. Monet puolestaan menettivät inhibitiokykynsä puhdasviljelynä. Alkuperäinen maljalla nähty pesäkkeen inhibition voimakkuus (taulukko IV.3) ei siten korreloinut puhdasviljelyn inhibitiokyvyn kanssa. Ongelma paheni, mitä pidempään jatkoviljelyjä jatkettiin. Myös säilytys (-70 °C) glyseroliin säilötyinä heikensi inhibitiokykyä useissa tapauksissa.

Tunnistetuista inhiboivista kannoista suurin osa oli *Staphylococcus epidermidis* –kantoja ja oraalisia streptokokkeja. Lisäksi kolme *Lactobacillus rhamnosus* -isolaattia ja yksi *Lactococcus lactis* –isolaatti löytyi inhibition perusteella.

Taulukko IV.4 Äidinmaidosta eristettyjen inhiboivien isolaattien tunnistus osittaisella 16S rRNA -sekensoinnilla. Lajitunnistuksen kriteerinä käytettiin 97 % samankaltaisuutta, kuten on kuvattu artikkelissa I.

Laji	Isolaatteja	Näytteiden lukumäärä
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	8
<i>Streptococcus salivarius</i>	8	5
<i>Streptococcus mitis</i>	6	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	2
<i>Streptococcus peroris</i>	3	3
<i>Streptococcus parasanguis</i>	1	1
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1

5 Antimikrobisten yhdisteiden karakterisointi

Äidinmaidosta eristettyjen inhiboivien bakteerikantojen antimikrobisten yhdisteiden ominaisuuksia selvitettiin useilla eri menetelmillä. Tulokset ovat kuitenkin tältä osin vaillinaisia, joten niiden julkaisemiseksi tarvitaan vielä lisäselvityksiä.

5.1 Inhibitio maljalla

Äidinmaidon kantojen kyky estää testiorganismien kasvua tutkittiin maljalla kasvavasta pesäkkeestä täpläkokeella tai siirrostamalla viljelmää lasisauvalla testausmaljalle. Taulukossa IV.5 ovat tulokset eräiden mielenkiintoisten kantojen osalta.

Taulukko IV.5 Äidinmaidosta eristettyjen puhdasviljelmien inhibitio eri testiorganismeja vastaan. Taulukossa ovat testaustulokset vain mielenkiintoisimmista, eli puhdasviljelminäkin vielä inhiboivista, kannoista. Arviot inhibition voimakkuudesta ovat silmämääräisiä.

<u>Äidinmaitokanta</u>	Testiorganismi:		
	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>
<i>Str. salivarius</i> MH1, MH2	++	+	+
<i>Staph. epidermidis</i> MH6, MH7	++++	++	++
<i>Str. salivarius</i> MH13, MH14	++	-	-
<i>Ent. faecalis</i> MH31	(+)	(+)	-
<i>Ent. faecalis</i> MH41	(+)	(+)	-
<i>Str. mitis</i> MH63	-	+	(+)
<i>Str. salivarius</i> MH64	-	++	+
<i>Str. salivarius</i> MH65	-	+	(+)
<i>Str. salivarius</i> MH69	(+)	+++	+
<i>Str. peroris</i> MH201	(+)	+	(+)
<i>Str. salivarius</i> M13, M14	+	(+)	+
<i>Str. mitis</i> M27, M30	(+)	+	(+)
<i>Str. parasanguis</i> M264	(+)	+	++

++++ = erittäin voimakas inhibitio

+++ = voimakas inhibitio

++ = kohtalainen inhibitio

+ = heikko inhibitio

(+) = erittäin heikko inhibitio

Osa kannoista testattiin tämän jälkeen agarkuoppamenetelmällä ja niiden pastöroituihin kasvuliemiin kokeiltiin eri proteinaasikäsittelyjä (proteinaasi K ja trypsiini) ja katalaasin vaikutusta (taulukko IV.6). Katalaasientsyymi hajottaa vetyperoksidia, joten vetyperoksidin tuotosta aiheutuva inhibitio häviää katalaasikäsittelyssä. Näin kävi ainoastaan kannalla *Str. salivarius* MH65, joka siis tällä perusteella tuottaisi vetyperoksidia.

Inhibitiotestauksissa oli erittäin yleinen ongelma, että saman kannan estokyky vaihteli eri koekerroilla eli toistettavuus oli huono. Taulukossa IV.6 esitetyt testaukset on tehty eri aikoina, joten niissä ilmoitettuja estovyöhykkeitä ei voi suoraan vertailla keskenään. Estokyvyn vaihtelua kuvasi se, että esimerkiksi *Staph. epidermidis* MH6 -kanta aiheutti yhdellä koekerralla

kuoppakokeessa (80 ul/kuoppa) halkaisijaltaan 16 mm:n kokoisen inhibitiokohdan (taulukko IV.6), mutta toisella kertaa kokeiltaessa esti testiorganismien kasvua vain osittain, hyvin heikosti. Yleinen suuntaus oli, että ajan myötä inhibitiokyky heikkeni. Tämä aiheutti ongelmia jatkotutkimuksissa, joihin valittiin alunperin hyvin inhiboivia pesäkkeitä, jotka sitten osittain kadottivat inhibitiokykynsä.

Taulukko IV.6 Äidinmaidosta eristettyjen kantojen kasvuliemien inhibitiotestaukset agarkuoppamenetelmällä *M. luteus* -bakteeria vastaan. Kuoppaan pipetoitiin 2 x 40 µl tai 2 x 50 µl tutkitun bakteerikannan pastöroitua kasvulientä. Taulukossa on inhibitio ilmaistu estokehän halkaisijana (mm), agarkuopan halkaisija itsessään oli noin 8 mm. Mitä suurempi estokehä, sitä voimakkaammin kyseinen bakteeri esti *M. luteus* -bakteerin kasvua. ProteinaasiK-, trypsiini- ja katalaasikäsittelyt tehtiin kuten on kuvattu materiaalit ja menetelmät -osiossa. Taulukossa diff. (= diffuusi) tarkoittaa, että estokehän reunat olivat epätarkat. *L. lactis* -kanta MH27 todettiin GFP-testauksella nisiinintuottajaksi (artikkeli I) ja *L. lactis* LAC280 -kanta on nisiiniä tuottava vertailukanta.

Kanta	Tutkittu uute		Käsittelyjen vaikutus estovyöhykkeeseen		
	tilavuus	estokehä	proteinaasiK	trypsiini	katalaasi
<i>Staph. epidermidis</i> M926	100	8,5	esti	ei analysoitu	ei analysoitu
<i>Staph. epidermidis</i> M928	100	9	esti	esti	ei analysoitu
<i>Staph. epidermidis</i> MH6	80	16 diff.	ei analysoitu	heikensi	ei analysoitu
<i>Staph. epidermidis</i> MH7	80	12 diff.	ei analysoitu	heikensi	ei analysoitu
<i>Str. salivarius</i> M13	100	18 diff.	ei vaikutusta	ei vaikutusta	ei vaikutusta
<i>Str. salivarius</i> M14	100	18 diff.	ei analysoitu	ei analysoitu	ei analysoitu
<i>Str. salivarius</i> MH65	100	15 diff.	ei analysoitu	ei vaikutusta	heikensi
<i>Str. mitis</i> M27	100	14 diff.	ei analysoitu	ei analysoitu	ei analysoitu
<i>Str. mitis</i> M30	100	14 diff.	ei vaikutusta	ei vaikutusta	ei vaikutusta
<i>Ent. faecalis</i> M809	80	17 diff.	ei analysoitu	ei analysoitu	ei analysoitu
<i>Ent. faecalis</i> MH31	100	18 diff.	ei vaikutusta	ei vaikutusta	ei vaikutusta
<i>Ent. faecalis</i> MH41	100	15 diff.	ei vaikutusta	ei vaikutusta	ei vaikutusta
<i>L. lactis</i> MH27	80	25	ei analysoitu	ei analysoitu	ei analysoitu
<i>L. lactis</i> LAC280	50	15	esti	ei vaikutusta	eivaikutusta

5.2 Nisiinintuotto

Tutkimuksessa löydettiin kahdelta eri äidiltä saaduista maitonäytteistä *L. lactis* -bakteereja. Kummatkin kannat todettiin GFP-menetelmällä nisiinintuottajiksi. Toinen kanta (MH27) on kuvattu artikkelissa 1, toinen (MH34) löytyi jatkotutkimuksissa.

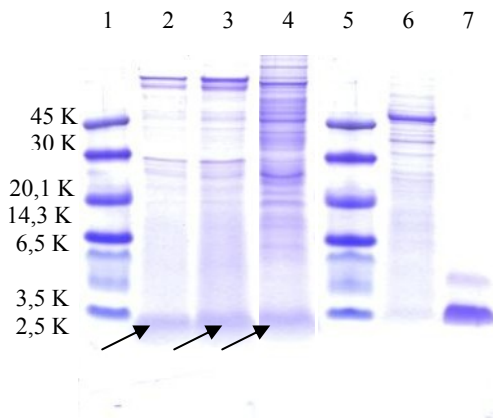
Jälkimmäinen kanta löytyi, kun maljalta eristettiin iso pesäke, joka jatkoviljelyissä osoittautui sisältävän kahta eri bakteerilajia. Toinen bakteeri tunnistettiin 16S rRNA -sekvensoinnilla *Leuconostoc mesenteroides* -lajiksi ja toinen *L. lactis* -lajiksi. Pesäkkeen inhibitio johtui selkeästi *L. lactis* -kannasta, sillä puhtasviljelmänä *L. mesenteroides* ei yksinään inhiboinut.

5.3 Proteiinigeelielektroforeesi

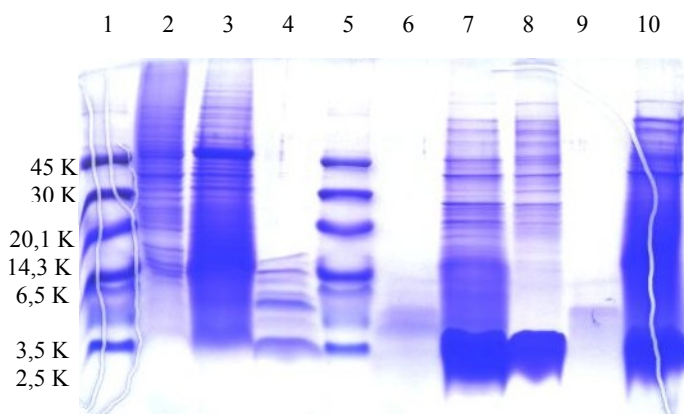
Bakteriosiinien koon arviointia varten kasvuliemestä väkevöitiin proteiinit hartsiin ja näytteet ajettiin proteiinigeelissä. Koska bakteriosiinit ovat pieniä proteiineja, molekyylipainoltaan noin 2000–5000 daltonia, niiden erottaminen ei kunnolla onnistu tavallisessa SDS-PAGE-proteiinigeelissä, jolla alle 20 kDa proteiinit erottuvat heikosti. Tutkimuksessa käytettiin Schaggerin ja von Jagovin (1987) kehittämää muunneltua analyysimenetelmää, joka on tarkoitettu erityisesti pienille, 1-30 kDa, proteiineille.

Äidinmaiton *Staph. epidermidis* MH6-, MH7- ja M928 -kannoilla näkyivät proteiinigeelissä juovat (kuva IV.2), jotka olivat kooltaan pienempiä kuin vertailunäyte nisiini A (3353 Da, kuva IV.2, kaista 7). Pelkkä kasvualusta ei tuottanut vastaavankokoisia juovia (ei kuvaa). Kyseiset proteiinit sopisivat siten koonsa perusteella olemaan bakteriosiineja, vaikka pelkästään geelikuvasta ei tätä voida päätellä.

Bakteriosiineja pyrittiin myös väkevöimään ja puhdistamaan kasvuliemestä Yangin ym. (1992) kuvaamalla pH-menetelmällä (kuva IV.3). Menetelmä perustuu siihen, että yleensä 93 - 100 % bakteriosiinimolekyyleistä tarttuu kiinni tuottajasolujen pintaan pH:n ollessa noin 6 ja suurin osa (> 95 %) irtoaa soluista kun pH on 1,5–2. Tällaisia bakteriosiineja voidaan puhdistaa ja konsentroida sitomalla ne ensin soluihin kiinni (pH 6.0), pesemällä solusakka ja irrottamalla bakteriosiinit tämän jälkeen jälleen liuokseen matalassa pH:ssa (1,5–2). Näin saadaan periaatteessa melko puhdasta bakteriosiinia. Tämän menetelmän on todettu toimivan ainakin nisiinille, pediosiinille ja leukonosiinille (Yang ym. 1992).



Kuva IV.2 Äidinmaidosta eristettyjen bakteerikantojen tuottamia proteiineja/peptidejä trisiini-SDS-PAGE-geelissä. Geelissä ovat resiinillä konsentroidut kasvuliemisupernatantit äidinmaitokannoista *Staphylococcus epidermidis* MH7 (kaista 2), *S. epidermidis* MH6 (kaista 3) ja *S. epidermidis* M928 (kaista 4) ja nisiiniä tuottavasta vertailukannasta *Lactococcus lactis* N8 (kaista 6). Kaistoissa 1 ja 5 ovat molekyylipainomerkit, joissa K = kilodaltonia ja kaistassa 7 on vertailunäyte nisiini A.

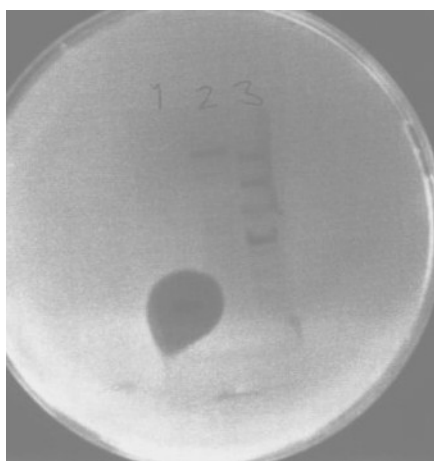


Kuva IV.3 Yangin ym. (1992) menetelmällä konsentroidut äidinmaidon bakteerikantojen ja referenssikannan tuottamat proteiinit/peptidit trisiini-SDS-PAGE-geelissä. Nisiiniä tuottavan *Lactococcus lactis* N8 -referenssikannan 2) solusakka, 3) kasvialusta ja 4) puhdistettu bakteriosiiniliuos, sekä äidinmaitokantojen *Staphylococcus epidermidis* MH7 6) puhdistettu bakteriosiiniliuos, 7) kasvialusta, 8) solut ja *S. epidermidis* MH6 9) puhdistettu bakteriosiiniliuos, 10) kasvialusta. Kaistoissa 1 ja 5 ovat molekyylipainostandardit, joissa K = kilodaltonia.

Tässä tutkimuksessa edellä kuvattu menetelmä toimi hyvin nisiiniä tuottavalla vertailukannalla, ja näytti puhdistavan pieniä proteiineja myös tutkituista äidinmaidon *Staph. epidermidis* -kannoista. Kuvasta IV.3 nähdään, että menetelmällä päästiin eroon suuresta osasta kasvuliemen isoja proteiineja. Nisiiniä tuottavalla vertailukannalla oli puhdistuksen jälkeen näkyvissä voimakas

nisiinin kokoinen juova (kaistassa 4 oleva alin juova noin 3,5 kDa:n kohdalla). Kaistassa oli kuitenkin myös muita juovia nisiinin yläpuolella. Niitä esiintyi myös Yangilla ym. (1992), ja ne ovat heidän mukaansa luultavasti solun pinnan tai soluseinän proteiineja. Äidinmaidon *Staph. epidermidis* -kannoilla voimakkaimmat juovat olivat noin 4 - 5 kilodaltonin kokoisia. Kasvualustassa ja solusakassa kuitenkin näkyvät erittäin voimakkaat nisiinin kokoluokkaa olevat juovat (kaistat 7, 8 ja 10 alimmat juovat), jotka eivät ole pH-menetelmässä konsentroituneet. Näyttäisi siis siltä, ettei pH-menetelmä ole konsentroinut kyseistä peptidiä kasvuliemestä, vaikka sitä on siinä hyvin runsaasti.

SDS-PAGE-geelistä voidaan havaita suoraan bakteriosiinin aiheuttama inhibitio valamalla päälle testiorganismi *M. luteus* Bhunian ja Johnsonin kuvaamalla menetelmällä (1992). Menetelmä toimi moitteettomasti puhtaalla nisiinillä, sillä geelissä erottuva nisiinijuova aiheutti voimakkaan inhibition *M. luteus* -maljalla (kuva IV.4). Nisiiniä tuottavilla referenssikannoilla *L. lactis* N8 ja LAC280 menetelmä ei kuitenkaan aina toiminut (kuva IV.4). Äidinmaidon kannoilla inhibitiota ei näkynyt geelistä tehdyissä maljatestauksissa.



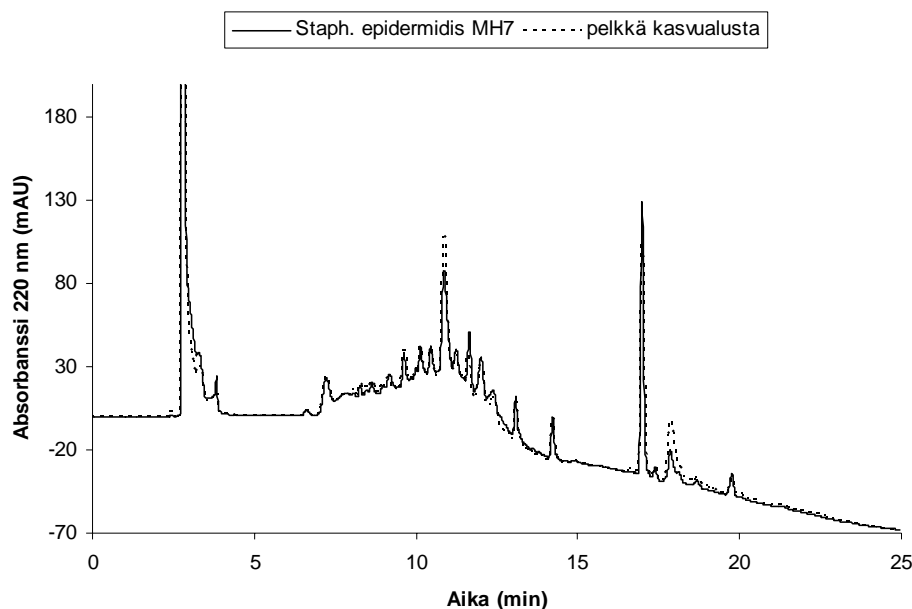
Kuva IV.4 Nisiinin aiheuttama *Micrococcus luteus* ATCC 10240 -bakteerin kasvun estyminen. Trisiini-SDS-PAGE-geeli huuhdeltiin ajon jälkeen ja asetettiin LB-maljalle, johon valettiin päälle pehmytagarkerroksessa testiorganismi. Tumma täplä maljalla osoittaa trisiini-SDS-PAGE-geelissä ajetun vertailunäytteen nisiini A:n aiheuttaman inhibition. *Lactococcus lactis* N8 -kannan konsentroitua kasvualustaa ja molekyylipainostandardit eivät aiheuttaneet estokehää.

5.4 Bakteriosiinien väkeväinti ja HPLC

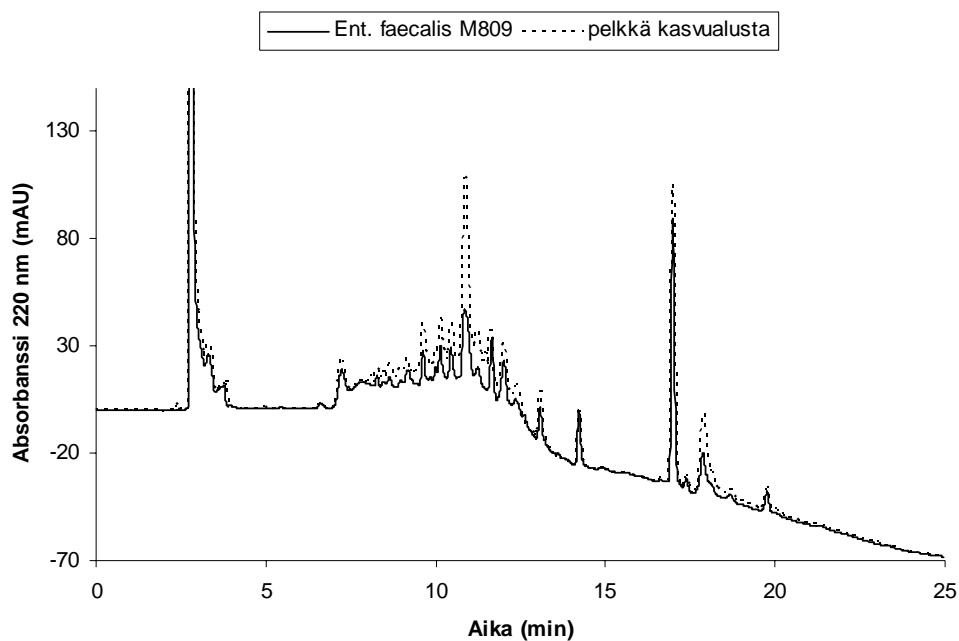
Kolmesta äidinmaitokannasta, *Staph. epidermidis* MH7, *Ent. faecalis* M809 ja *Str. peroris* MH201, pyrittiin väkevöimään bakteriosiineja kasvuliemistä ja puhdistamaan niitä HPLC:n avulla.

Väkevöinnissä ennen HPLC-ajoa käytettiin pääasiassa kahta eri menetelmää, C18-kiinteäfaasiuuttoa ja ammoniumsulfaattisaostusta.

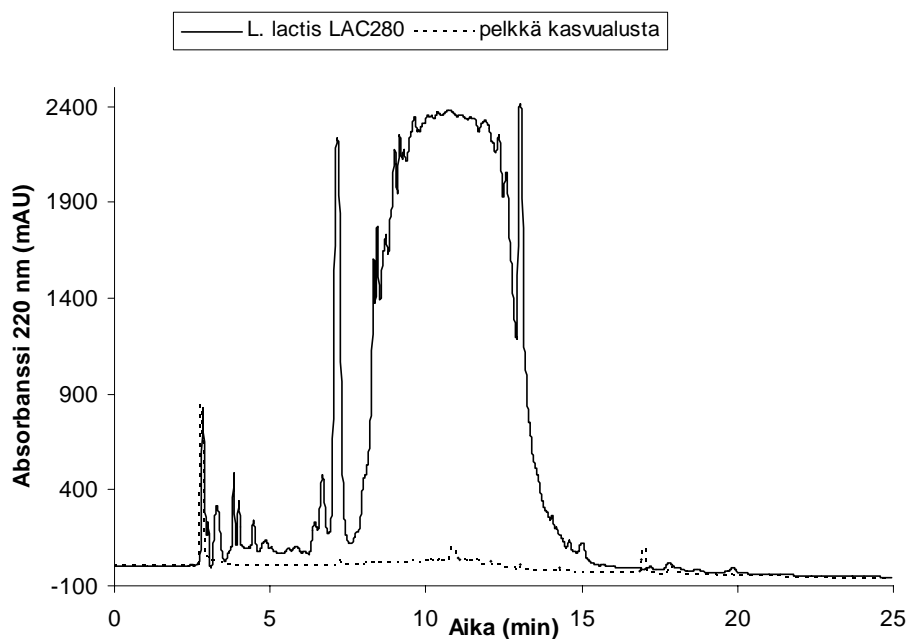
C18-kiinteäfaasiuuttoa, joka perustuu bakteriosiinien C-terminaalisen osan hydrofobisuuteen, on yleisesti käytetty bakteriosiinien esipuhdistuksessa ja väkevöinnissä ennen HPLC-ajoa (Guyonnet ym. 2000, Ghrairi ym. 2005). Kantojen *Staph. epidermidis* MH7 ja *Ent. faecalis* M809 kasvuliemet väkevöitiin C18-kiinteäfaasiuuttopylväässä. Tästä saatiin näyte käänteisfaasi-C8-HPLC-pylvääseen. Kyseisellä menetelmällä ei kuitenkaan saatu kasvualusta-taustasta (M17G) poikkeavia piikkejä näkyviin kromatogrammeissa (kuvat IV.5 ja IV.6). Syitä voi olla useita: bakteriosiinien väkevöinti ei onnistunut käytetyllä menetelmällä, bakteriosiinit eivät tarttuneet kromatografiapylvääseen tai kasvuliemestä aiheutunut tausta oli liian vahva.



Kuva IV.5 Kannan *Staph. epidermidis* MH7 käänteisfaasi-HPLC-eluutioprofiili.



Kuva IV.6 Kannan *Ent. faecalis* MH809 C8-HPLC-elutioprofiili.

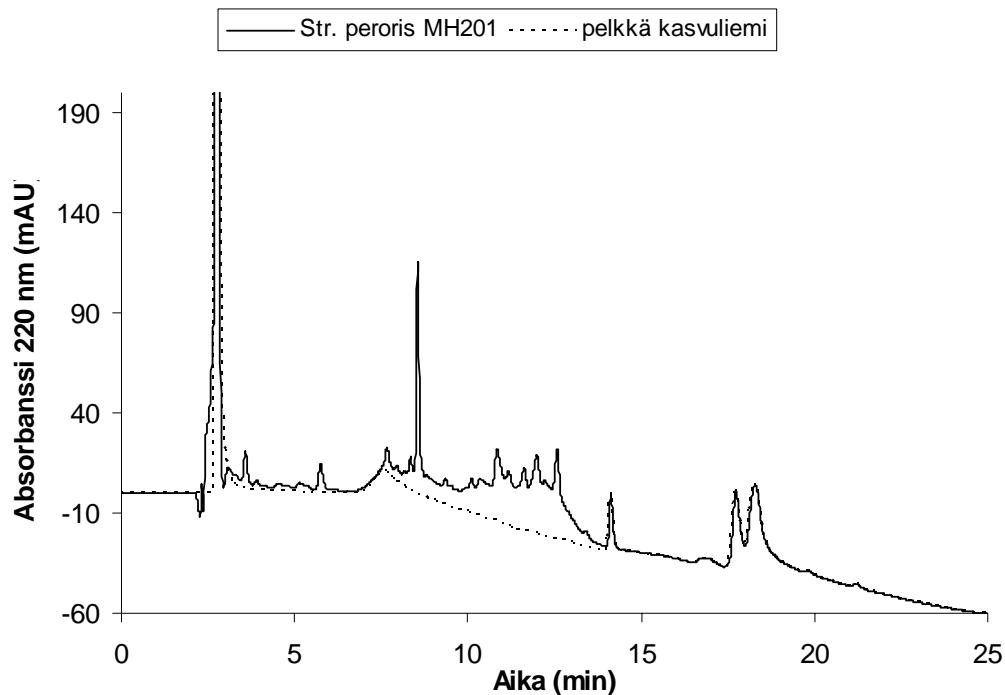


Kuva IV.7 Nisiiniä tuottavan referenssikannan *L. lactis* LAC280 C8-HPLC-elutioprofiili.

Nisiiniä tuottavalla vertailukannalla näkyi kromatogrammissa selvästi piikkejä, jotka erosivat kasvualustan (M17G) aikaansaamasta taustasta (kuva IV.7). Ajon yhteydessä kerätyistä jakeista voitiin aktiivisuuden perusteella todeta, että nisiini eluoitui 11–12 minuutin välillä tulleissa jakeissa. Kromatogrammissa (kuva IV.7) ei kuitenkaan tuolla ajanhetkellä näy selkeää erillistä nisiinipiikkiä,

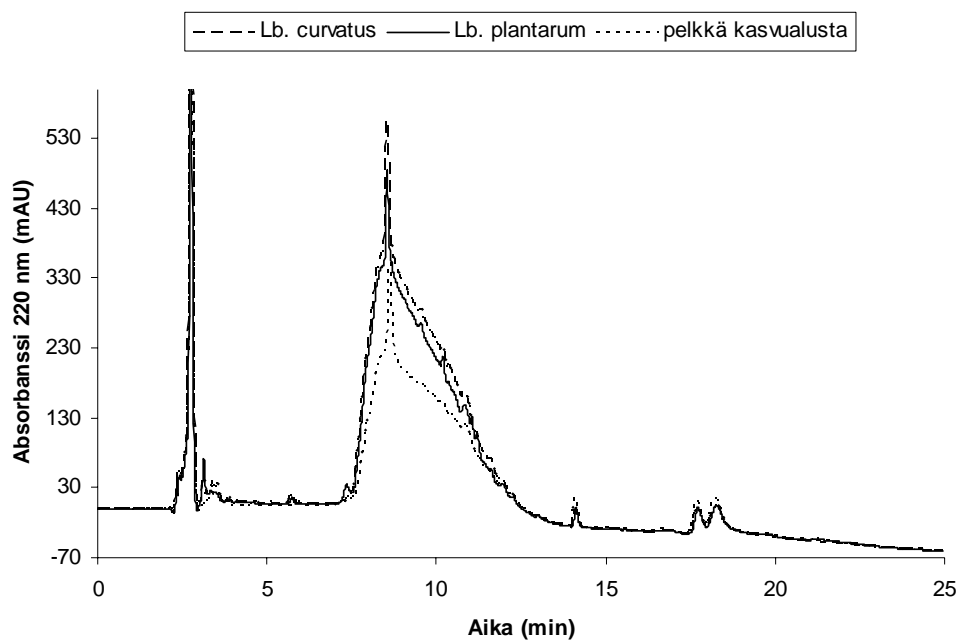
vaan nisiini eluoitui ison, yhtenäisen piikkiklusterin mukana. Tämä johtuu luultavasti preparatiivisessa ajossa käytetystä suuresta näytemäärästä, pienempi näyteinjektio saattaisi antaa selkeämmän kromatogrammikuva.

Kolmannen tutkitun kannan, *Str. peroris* MH201, todettiin estävän *M. luteus* -bakteerin kasvua (taulukko IV.5). Sen kasvualustasta väkevöitiin proteiinit 70 % ammoniumsulfaattisaostuksella. HPLC-kromatogrammissa näkyi selvä ero piikeissä pelkän kasvualustan (M17G) ja MH201-kasvuliemen välillä (kuva IV.8) eli M201 oli tuottanut jotain yhdisteitä kasvualustaan.



Kuva IV.8 Kanan *Str. peroris* MH201 C8-HPLC-elutioprofiili.

Menetelmällä ei saatu bakteriosiineja tuottavista vertailukannoista *Lb. curvatus* SAA263 (bavarisiini) tai *Lb. plantarum* SAA260 (pediosiini) näkyviin kasvualustasta (MRS) poikkeavia erillisiä piikkejä (kuva IV.9). On kuitenkin mahdollista, että kyseisten kantojen tuottamat bakteriosiinit ovat eluoituneet kromatogrammissa näkyvän ison piikkiklusterin (kuva IV.9. 7–14 min) mukana. Kasvualusta (MRS) on aiheuttanut voimakkaan taustan, jonka vuoksi erillisiä piikkejä ei saatu näkyviin. Tämä johtuu luultavasti siitä, että MRS-kasvualusta on tyypillisesti voimakkaan väristä, tummanruskeaa. Ongelmasta voidaan päästä eroon puhdistamalla näyte paremmin ennen HPLC-ajoa.



Kuva IV.9 Bakteriosiineja tuottavien referenssikantojen *Lb. curvatus* SAA263 (bavarisiini) ja *Lb. plantarum* SAA260 (pediosiini) C8-HPLC-elutioprofiilit. Virtaus 0,6 ml/min, 20 minuutin lineaarinen 5–100 % isopropanoligradientti 0,05 % trifluoroetikkahapossa.

IV Tulosten tarkastelu

Aiemmin äidinmaidon mikrobiologiset tutkimukset ovat keskittyneet etsimään tautia aiheuttavia bakteereita, lähinnä sairaalojen äidinmaitopankkien käyttöturvallisuutta ajatellen (Caroll ym.1979, Eidelman ja Szilagyi 1979, Law ym. 1989, Bingen ym. 1992, El-Mohandes ym. 1993a, Wright ja Feeny 1998, Novak ym. 2000, LeThomas ym. 2001). Tässä tutkimuksessa keskityttiin ensimmäistä kertaa äidinmaidon luontaiseen bakteeristoon ja sen kykyyn estää taudinaiheuttajia. Tutkimuksen keskeisin uusi löydös on, että äidinmaidossa esiintyi yleisesti *Staph. aureus* -, *L. innocua* -ja *M. luteus* -bakteerien kasvua estäviä mikrobeja. Noin 40 prosentissa näytteistä kasvoi pesäkkeitä, jotka estivät *Staph. aureus* -lajin kasvua (artikkelin (I) taulukko 3). Noin kolmanneksesta näytteitä eristettiin *L. innocua* - ja kymmenesosasta *M. luteus* -lajia torjuvia mikrobeja (taulukko IV.3). Myös puhdasviljelmiksi eristetyt bakteerikannat inhiboivat yleisesti *Staph. aureus* -bakteeria (artikkeli (I) taulukko 3). Kaksi äidinmaidosta eristettyä *Lactococcus lactis* -kantaa tuotti bakteriosiinia, nisiiniä.

Tässä tutkimuksessa indikaattorina käytetty *M. luteus* on herkkä monille bakteriosiineille ja sitä on käytetty laajasti testiorganismina erilaisia bakteriosiineja tutkittaessa (mm. Wescombe ym. 2006, Li ym. 2005, Risøen ym. 2004, Saeed ym. 2004, Pongtharankul ja Demirci 2004). Muut indikaattorikannat, *L. innocua* ja *Staph. aureus*, valittiin niiden kliinisen kiinnostavuuden vuoksi. *Staph. aureus* on yleisin rintatulehdusbakteeri (Michie ym. 2003), joka voi aiheuttaa vastasyntyneellä monenlaisia tulehduksia, kuten iho-, pehmytkudos- ja virtsatietulehduksia sekä keuhkopaiseita ja verenmyrkytyksiä (Fortunov ym. 2006). Lisäksi metisilliinille vastustuskykyiset *Staph. aureus* -kannat ovat tärkein sairaalainfektoiden aiheuttaja (Vos ja Verbrugh 2005). *Listeria innocua*, joka ei ole taudinaiheuttaja (Hain ym. 2006), toimi tässä tutkimuksessa mallina läheistä sukua olevalle *L. monocytogenes* -bakteerille, joka voi aiheuttaa vastasyntyneelle vakavia infektoita, kuten aivokalvontulehduksia, keuhkokuumetta, verenmyrkytyksiä, sydämen vajaatoimintaa ja sydänlihastulehduksia (Posfay-Barbe ja Wald 2004). Se voi aiheuttaa vakavia oireita myös aikuisilla, ja johtaa raskausaikana sikiön abortoitumiseen. *L. innocua* -lajia on käytetty useissa tutkimuksissa mallibakteerina *L. monocytogenes* -lajin sijaan (mm. Vescovo ym. 2006, Castellano ja Vignolo 2006).

Tämän tutkimuksen kuluessa on ilmestynyt uusia selvityksiä, jotka tukevat näkemystä äidinmaidon normaalibakteerien hyödyllisyydestä (Martin ym. 2006, Olivares ym. 2006, Martin ym. 2005, Beasley ja Saris 2004, Martin ym. 2003). Martin ym. (2003) totesivat, että äidinmaito on vauvalle luonnollinen maitohappobakteerien lähde. He osoittivat, että äidinmaidon laktobasilleilla on probioottisia eli terveyttä edistäviä ominaisuuksia (Martin ym. 2005, Martin ym. 2006). Beasleyn ja Sariksen (2004) tutkimuksessa nisiiniä tuottavia laktokokkeja löytyi 30 prosentista

äidinmaidonäytteitä. Nisiini tappaa monia patogeeneja, kuten listeriaa ja *Staph. aureus* -bakteeria (Chen ja Hoover 2003).

Äidinmaidosta eristettyjä maitohappobakteereita on nyt myös otettu käyttöön. Espanjassa Puleva Biotech –niminen yritys lanseerasi vuonna 2006 markkinoille äidinmaidosta eristetyillä probioottisilla laktobasilleilla fermentoituja hapanmaitotuotteita, joiden tavoittena on parantaa lasten puolustusjärjestelmän toimintaa.

Näiden tutkimusten perusteella rintamaidossa esiintyviä bakteereita eivät ole vain haitallisia kontaminantteja, kuten on aiemmin ajateltu (el-Mohandes ym. 1993b, May 1988, West ym. 1979, Wright 1947). Pitkään vallalla olleen käsityksen mukaan rinnan sisällä ei ole bakteereita ja äidinmaidossa on niin paljon antimikrobisia yhdisteitä, että se on luontaisesti steriiliä. Rintamaidossa esiintyvien bakteerien on siten ajateltu päätyvän näytteisiin kontaminantteina äidin nännin iholta, vauvan suusta, ympäristöstä, tai rintapumpusta (el-Mohandes ym. 1993b, West ym. 1979). Nyt on kuitenkin herätty ajattelemaan, että rintamaidossa on luonnostaan bakteereita (Martin ym. 2003, Martin ym. 2004), jotka voivat myös kolonisoida maitotiehyitä (WHO 2000).

Useat mielenkiintoiset kysymykset vaativat vielä lisäselvitystä: Miten pysyvästi bakteerit kolonisoivat rintaa ja onko niitä imetysaikana myös rinnan sisällä maitotiehyissä? Estävätkö äidinmaidon normaalibakteerit rintatulehduksia? Selviävätkö ne vauvan suolistoon ja estävätkö ne siellä tulehduksia? Miten bakteerit päätyvät äidinmaitoon ja onko niitä maitotiehyissä? Miten bakteerikoostumus vaihtelee asuinpaikasta riippuen ja eri puolilla maailmaa? Vaikuttaako äidin ravitsemus bakteerien määrään ja koostumukseen? Onko äidinmaidon bakteereilla merkitystä puolustusjärjestelmän toiminnan edistäjinä, allergioiden estämisessä tai vauvan suoliston "siedättämisessä"? Vaikka lisäselvitykset ovat tarpeen, tämä tutkimus antoi tärkeän alun äidinmaidon luontaisen bakteeriston tutkimiseen ja antoi ensimmäisen aavistuksen siitä, että rintamaidon bakteerit voivat olla myös hyödyllisiä.

Tämän tutkimuksen mukaan vauva saa päivittäin arviolta 8×10^4 – 8×10^6 bakteeria nauttimansa rintamaitoannoksen mukana. Määrä on luultavasti todellisuudessa vielä huomattavasti tätä suurempi, sillä kaikki bakteerit eivät kasva anaerobisesti kyseisissä olosuhteissa ja kyseisellä kasvualustalla. Näin ollen vasta-aineiden ja valkosolujen ohella äidinmaidon bakteerit ovat yksi merkittävä äidinmaidonkorvikkeista puuttuva biologinen komponentti. Onkin mahdollista, että tulevaisuudessa äidinmaidosta peräisin olevia bakteereita tullaan lisäämään korvikkeisiin, joista pyritään nykyisin tekemään koostumukseltaan yhä enemmän rintamaitoa muistuttavia. Suomessa on tutkittu korvikkeita, joihin on lisätty probioottisia *Lactobacillus rhamnosus* GG - ja *Bifidobacterium lactis* Bb-12 -kantoja. Tällaisen korvikkeen on todettu lisäävän IgA:n tuotantoa ja arvellaan nopeuttavan

vastasyntyneen puolustusjärjestelmän kehittymistä verrattuna tavalliseen korvikkeeseen (Rautava ym. 2006).

1 Äidinmaidon bakteeridiversiteetti

Tämä tutkimus kartoitti ensimmäistä kertaa viljeltyjen bakteerien molekyylibiologiseen tunnistamiseen perustuvien menetelmien äidinmaidon bakteeriston lajikoostumusta (artikkeli (I) taulukko 1). Aiemmat tutkimukset ovat käyttäneet lähinnä metabolisia testejä ja perinteisiä taksonomisia tunnistusmenetelmiä.

Tässä tutkimuksessa käytetty MRS-kasvualusta ja anaerobiset olosuhteet mahdollistavat maitohappobakteerien kasvun, sillä monet niistä kasvavat hitaasti tai eivät ollenkaan aerobisesti yleiskasvualustoilla, kuten tryptoni-hiivauute-glukoosi (THG) -maljalla. Vaikka yleiskasvualustoja käytetään perinteisesti bakteerien anaerobisen ja aerobisen lajikoostumuksen määrittämisessä, toisinaan ne kertovat diversiteetistä puoliselektiivisiä kasvualustoja huonommin, kuten suolistobakteeritutkimuksissa (Rautava 2000). Siksi tässä tutkimuksessa valittiin alusta, jonka tiedetään suosivan äidinmaidon luontaisen bakteeriston kasvua. Myös tutkimuksessa käytetyt anaerobiset olosuhteet myös muistuttavat olosuhteita rinnan sisällä.

Tuloksissa on otettava huomioon, että kaikki bakteerit, kuten useat gramnegatiiviset bakteerit, eivät kykene kasvamaan MRS-maljalla. Toisaalta, mikään yksittäinen kasvualusta ja kasvuolosuhteet (lämpötila, happipitoisuus) eivät anna kokonaiskuvaa mikrobistosta. Lisäksi aiempien tutkimusten pohjalta tiedetään (Caroll ym. 1979, Eidelman ja Szilagy 1979, West ym. 1979), että pääosa äidinmaidosta löydettyistä bakteereista on MRS-kasvualustalla kasvamaan kykeneviä grampositiivisia bakteereita.

1.1 Stafylokokit

Tulokset osoittavat, että koagulaasinegatiiviset stafylokokit ja oraaliset streptokokit ovat terveen äidin rintamaidon valtabakteereita, riippumatta siitä viljelläänkö näytteitä anaerobisesti (tämä tutkimus) vai aerobisesti (Caroll ym. 1979, Eidelman ja Szilagy 1979, West ym. 1979). Tässä tutkimuksessa ylivoimaisesti yleisin laji oli *Staph. epidermidis*, joka edusti jopa puolta kaikista satunnaisotannalla eristetyistä isolaateista. Sen on havaittu olevan vallitseva rintamaidon laji myös muissa tutkimuksissa (Caroll ym. 1979, Eidelman ja Szilagy 1979, West ym. 1979). Se on yleisin ihmisillä esiintyvä stafylokokkilaji. Samasta terveestä ihmisyksilöstä on eristetty jopa 24 erilaista kantaa (Huebner ja Goldmann 1999).

Staph. hominis, joka oli tässä tutkimuksessa toiseksi yleisimmin äidinmaidosta eristetty stafylokokkilaji, on toiseksi tavallisin ihmisillä esiintyvä laji. Se on vallitseva käsivarren, jalkojen ja

vartalon kuivissa ihon kohdissa. Kolmanneksi yleisin äidinmaidon stafylokokkilaji, *Staph. capitis*, puolestaan esiintyy lähes yksinomaan ihmisen pään alueella (Huebner ja Goldmann 1999). Lieneekin mahdollista, että vauva on siirtänyt kyseisen bakteerin imetyksen yhteydessä äidin rinnan iholle.

Stafylokokkien tyypillisin elinympäristö on nisäkkäiden iholla ja limakalvoilla, joissa pitoisuudet ovat yleensä luokkaa 10^4 – 10^6 pmy/sm² (Huebner ja Goldmann 1999). Pitoisuudet ovat erityisen korkeita ihon kosteissa kohdissa, kuten taiveissa. Stafylokokkien on perinteisesti ajateltu päätyvän maitoon nänнин iholta (West ym. 1979, Pittard ym. 1985, Eidelman ja Szilagyi 1979).

Bakteerien esiintymistä imetysaikana maitotiehyissä rinnan sisällä ei ole tutkittu. WHO:n katsaus (2000) arvioi, että äidin maitotiehyet, kuten myös vauvan nenänielu, kolonisoituvat normaalibakteeristolla nopeasti syntymän jälkeen. Asiaa on tutkittu lypsylehmillä, joilla on löydetty utareen sisältä otetuista näytteistä vallitsevina bakteerilajeina koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja, *Staph. xylosus*-, *Staph. arlettae*- ja *Staph. cohnii* -lajeja (Gill ym. 2006). Koska ihmisrinnassa maito virtaa aina imetyskerran jälkeen takaisin ylöspäin maitotiehyissä (Ramsay ym. 2005), voisivat bakteerit teoriassa kulkeutua virran mukana nännistä eri puolille maitotiehyitä, ehkä maitorakkuloihin asti. Tämä voisi selittää myös rintatulehdusbakteerien pääsyn maitorakkuloihin. WHO:n katsauksessa (2000) kyseistä reittiä pidetään mahdollisena, mutta vaativan lisäselvittelyä.

On vielä osittain epäselvää, miten paljon äidinmaidon antimikrobiset komponentit estävät normaalibakteerien kasvua. Pitkään äidinmaitoa säilytettäessä ainakin stafylokokit näyttäisivät pystyvän lisääntymään maidossa. Pittardin ym. (1985) tutkimuksessa äidinmaitonäytteitä säilytettiin huoneenlämmössä 24 tunnin ajan. Bakteerimäärät kasvoivat maidossa merkittävästi, ja *Staph. epidermidis* -bakteeri säilyi vallitsevana lajina. Streptokokkien määrä sen sijaan väheni säilytyksen aikana. Pittard ym. (1985) uskovat, että bakteerimäärän kasvua selittää äidinmaidon antimikrobisten komponenttien hajoaminen ajan myötä. Määrät eivät samassa ajassa merkittävästi kasvaneet kolostrumissa, jossa antimikrobisia komponentteja, kuten immunoglobuliineja, lysotsyymiä ja laktoferriiniä, on enemmän kuin valmiissa maidossa.

Pittardin ym. (1985) selvitystä tukeva alustava havainto stafylokokkien selviämisestä äidinmaidossa tehtiin myös tämän tutkimuksen yhteydessä (tulokset julkaisematta). Äidinmaitonäytteitä (n = 3) kasvatettiin +30 °C:ssa 2 vuorokauden ajan, jolloin niiden pH laski alkuperäisestä n. 6,5–7:stä noin 5–6:een. Näytteistä tehtiin pintahajotukset M17G-maljoille ennen ja jälkeen kasvatuksen, eikä solujen morfologiassa havaittu mikroskopoinnin perusteella eroa. Kasvatuksen jälkeisestä viljelmästä eristettiin satunnaisesti puhtasviljelmiä (8 kpl/näyte). Kahden näytteen viljelmät muistuttivat mikroskopoinnissa stafylokokkeja ja yhden sekä laktokokkeja/streptokokkeja (7 kpl) että stafylokkeja (1 kpl). Nämä alustavat havainnot vaativat

jatkotutkimuksia. Pitäisi käyttää isompia näytemääriä, kartoittaa pesäkemäärät eri vaiheissa ja tunnistaa lajisto. Erona tässä alustavassa tutkimuksessa verrattuna Pittardin ym. tutkimukseen oli, että näytteet eivät olleet tuoreita vaan pakastettuja. Pakastus heikentää äidinmaidon antimikrobisia ominaisuuksia, joten jatkotutkimukset tulisi tehdä tuoreista näytteistä.

Yksi huolenaihe, joka on usein liitetty koagulaasinegatiivisten bakteerien esiintymiseen äidinmaidossa, on niiden mahdollinen taudinaiheuttamiskyky (el-Mohandes 1993a ja b, Boo ym. 2001, Ng ym. 2004). Monet koagulaasinegatiiviset stafylokokit ovat opportunisteja patogeeneja, jotka voivat sopivissa olosuhteissa aiheuttaa tulehduksen. Ne ovat yleisiä sairaalainfektioiden aiheuttajia, erityisesti hyvin pienillä keskosilla ja muilla vastustuskyvyltään heikentyneillä (katsaus: Venkatesh ym. 2006). Ainakin *Staph. epidermidis*-, *Staph. hominis*- ja *Staph. lugdunensis* -lajien, joita löydettiin tässä tutkimuksessa äidinmaidosta, tiedetään aiheuttaneen tulehduksia. Kun otetaan huomioon, että vauva saa kyseisiä bakteereita äidinmaidon kautta päivittäin hyvin paljon, voisi sen ajatella lisäävän rintaruokittujen vauvojen tartuntariskiä. Asia on tutkimusten mukaan kuitenkin päinvastoin. Äidinmaitoa nauttineilla tehohoitoa saavilla vastasyntyneillä esiintyy vähemmän bakteerien aiheuttamia verenmyrkytyksiä kuin korvikeruokituilla (El-Mohandes ym. 1997, Rönnestad ym. 2005). Näin siitä huolimatta, että *Staph. epidermidis* on sekä yleisin heikkokuntoisten vastasyntyneiden verenmyrkytysten aiheuttaja sairaaloissa että yleisin bakteeri äidinmaidossa (el-Mohandes ym. 1993a). Koska muissakin tutkimuksissa on päädytty samansuuntaisiin tuloksiin, johtopäätös on, etteivät äidinmaidon koagulaasinegatiiviset stafylokokit aiheuta tulehdusriskiä vastasyntyneelle (Jones 2001, Law ym. 1989).

Äidinmaidosta eristettiin tässä tutkimuksessa myös opportunistisesti patogeenisia, koagulaasipositiivisia *Staph. aureus* -bakteereita, joiden on aiemmissakin tutkimuksissa todettu esiintyvän terveiden imettävien äitien maidossa (Caroll ym. 1979, West ym. 1979, Law ym. 1989 ja El-Mohandes ym. 1993a). Niitä esiintyi noin 13 prosentissa näytteistä, mikä on samaa luokkaa aiempien tutkimusten kanssa (vrt. taulukko I.7). Vaikka *S. aureus* esiintyy melko useiden äitien maidossa, sen on vain erittäin harvoissa tapauksissa todettu aiheuttaneen äidinmaidon kautta infektioita vauvoille. Tartuntoja ovat saaneet lähinnä vastustuskyvyltään heikot keskosvauvat (Le Thomas ym. 2001, Behari ym. 2004, Gastelum ym. 2005). Näyttäisi siis siltä, ettei *Staph. aureus* -bakteeri yleensä aiheuta ongelmia terveellä rintamaitoa nauttivalla vastasyntyneellä. Kawada ym. (2003) todistivat pahamaineisen metisilliiniresistentin *Staph. aureus* -kannan (MRSA) siirtyneen rintamaidon kautta terveeltä äidiltä terveelle vauvalle oireita aiheuttamatta.

1.2 Maitohappobakteerit

Maitohappobakteerien luokittelusta on kiistelty jo pitkään, eivätkä rajat ole vieläkään selvät, mutta tällä hetkellä maitohappobakteereihin kuuluvia bakteerisukuja ovat *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*- ja *Weissella*. Myös *Bifidobacterium* -lajit, jotka aiemmin tunnettiin nimellä *Lactobacillus bifidum*, on aiemmin liitetty maitohappobakteereihin. Ne eivät kuitenkaan ole fylogeneettisesti sukua maitohappobakteereille ja niillä on maitohappokäymisestä poikkeava sokerien fermentaatiomekanismi (Axelsson 2004).

Maitohappobakteeri sanana yhdistyy mielikuvissa elintarvikkeiden valmistuksessa ja probiootteina käytettäviin hyödyllisiin bakteerilajeihin. Tällaisia ovat mm. hapanmaitotuotteiden, makkaroiden, hapankaalin ja viinin valmistuksessa yleisesti käytettävät suvut eli *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ja *Oenococcus*. Streptokokkeja ja enterokokkeja, joista osa on opportunistisia taudinaiheuttajia, ei useissa yhteyksissä lasketa "perinteisiin" maitohappobakteereihin. Streptokokeista vain yksi laji, *Streptococcus thermophilus*, on laajamittaisessa käytössä elintarvikkeiden valmistuksessa (Axelsson 2004). Enterokokkeja ei käytetä yleisesti elintarvikkeiden valmistuksessa, vaikka niitä esiintyykin Etelä-Euroopan perinteisissä juustoissa. Niitä on myös käytetty probiootteina (Franz ja Holzapfel 2004).

Äidinmaidosta satunnaisotannalla eristetyistä kannoista Axelssonin (2004) mukaan luokiteltuna maitohappobakteereita oli tässä tutkimuksessa yhteensä yli kolmannes (artikkelin (I) taulukko 1). Suurin osa, 85 %, näistä kannoista oli streptokokkeja ja 12 % enterokokkeja. Näistä on kerrottu tarkemmin jäljempänä. Yllä luokiteltuja "perinteisiä" maitohappobakteereita esiintyi satunnaisotannassa (n = 40) kahdessa maitonäytteessä, joista eristetyt kannat tunnistettiin *Lb. rhamnosus* -lajeiksi. Näiden lisäksi löydettiin äidinmaidosta jatkotutkimuksissa muilla menetelmillä *Lb. crispatus*-, *Lb. gasseri*-, *Lactobacillus* sp.-, *L. lactis*- ja *Leuc. mesenteroides* -lajeja. Näistä *Lb. crispatus*-, *Lb. rhamnosus*-, *L. lactis*- ja *Leuc. mesenteroides* -lajit eristettiin nyt ensimmäistä kertaa äidinmaidosta. Yhteensä perinteisiä maitohappobakteereita eristettiin 15 kantaa, kahdeksan eri äidin maidosta, eli noin 6 prosentista kaikista näytteistä (n = 141).

Äidinmaidosta tässä tutkimuksessa löydettyistä laktobasilleista *Lb. crispatus* ja *Lb. gasseri* ovat tavallisia terveen naisen emättimen bakteerilajeja (Vasquez ym. 2002). Kahden eri äidin maidosta eristetyt *Lb. rhamnosus* -kannat puolestaan olivat Valiolla tehdyissä jatkotutkimuksissa RAPD-profiililtaan identtisiä kaupallisen probioottisen *Lb. rhamnosus* GG -kannan kanssa. Kyseinen bakteeri löytyi myös toisen äidin vauvan ulosteesta, mikä tukee aiempia tuloksia (Goldin ym. 1992), joiden mukaan *Lb. rhamnosus* GG selviää hyvin suolistossa.

Äidinmaidossa esiintyneiden laktobasillien alkuperää ei tässä tutkimuksessa selvitetty, mutta yksi mahdollinen lähde on äidin synnytyskanava. Koska laktobasillit ovat vallitseva bakteeriryhmä terveen naisen emättimessä (Vasquez ym. 2002), on mahdollista, että vauva on saanut kyseiset bakteerit emättimestä alatiesynnytyksen yhteydessä ja siirtänyt imetyksessä rintaan. Tämä hypoteesi pohjautuu havaintoon, jonka mukaan patogeeninen *Streptococcus agalactiae* on siirtynyt kyseistä reittiä äidin emättimestä äidinmaitoon (Atkins ym. 1998). Viitaten tämän tutkimuksen artikkeliin (I) Martin ym. (2004) pitivät kuitenkin tätä laktobasilleille ehdotettua reittiä epätodennäköisenä. He arvelevat, että laktobasillit voivat kulkeutua äidin suolistosta maitoon elimistön sisäistä reittiä myöten, joka on kuvattu kirjallisuusosan kappaleessa 4.1. Kyseinen tutkimusryhmä havaitsi hiirikokeissa, että geneettisesti leimattu *Enterococcus faecium* HA1 –kanta siirtyi oraalisesti annettuna sikiöveteen. He myös löysivät maitohappobakteereita sektiolla syntyneiden lasten istukkaverestä. Tunnistetut kannat olivat *Enterococcus faecium*-, *Propionibacterium acnes*-, *Staphylococcus epidermidis*- ja *Streptococcus sanguinis* –lajeja (Jiminez ym. 2005).

Ennen tätä tutkimusta äidinmaidosta oli eristetty yksi *Lactobacillus plantarum* -kanta (West ym. 1979) ja *Lb. reuteri* -kanta (Reid 1999), sekä kolme *Lb. gasseri* -kantaa (Matsumiya ym. 2002). Tämän tutkimuksen kuluessa aihetta on kuitenkin selvitetty lisää.

Martin ym. (2003) löysivät maitohappobakteereita, *Lb. gasseri* ja *Lb. fermentum*, kaikista tutkimistaan maitonäytteistä (8/8). Ero tässä tutkimuksessa havaittuun esiintymistiheyteen (6/141) on siis suuri. Eroa voivat selittää Martinin ym. (2003) käyttämä suurempi viljelty näytetilavuus ja suuri eristettyjen kantojen määrä näytettä kohti. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin neljää eri kasvualustaa, MRS-, KAA-, VRBA- ja Nutrient –agarmaljoja, jolloin saatu bakteerilajisto on laajempi. Tässä tutkimuksessa rajoituttiin käyttämään MRS ja LBS –kasvualustoja anaerobisissa olosuhteissa. Tutkimuksen tarkoitus oli myös erilainen: Martinin ym. (2003) tutkimus lähti etsimään äidinmaidon potentiaalisesti probioottisia maitohappobakteereita. Tässä tutkimuksessa (artikkeli I) sen sijaan selvitettiin äidinmaidon tyypillistä bakteerikoostumusta satunnaisotannalla anaerobisissa olosuhteissa MRS-maljalla. Lisäksi tutkittiin laktobasillien esiintymistä LBS-kasvualustalla. Eroa lajikoostumuksessa voi selittää myös se, että Martinin ym. (2003) tutkimuksessa kaikki näytteet olivat pian synnytyksen jälkeen (4 vrk) otettuja. Tällöin synnytyskanavan kautta mahdollisesti kulkeutuneiden laktobasillien osuus korostuu.

Martin ym. (2006) löysivät myöhemmin myös *Lb. salivarius* -kannan yhden äidin rintamaidosta. Lisäksi äidinmaidon laktobasilleja tutkivat Sinkiewicz ja Nordström (2005), jotka löysivät 12 prosentista äidinmaitonäytteistä (n = 226) *Lb. reuteri* -bakteereja. Laktobasilleja näyttäisi siten esiintyvän äidinmaidossa muissa maissa tässä tutkimuksessa havaittua yleisemmin. Suomalaisen

äidinmaidon maitohappobakteerikoostumusta pitäisikin siksi selvittää tarkemmin lisätutkimuksessa useita erilaisia kasvualustoja käyttäen.

Laktobasillien lisäksi tässä tutkimuksessa löydettiin perinteisistä elintarvikkeiden hapattajina käytettävistä maitohappobakteereista yksi *Leuconostoc mesenteroides* -kanta ja kaksi *L. lactis* -kantaa. *Leuc. mesenteroides* on laji, joka esiintyy yleisimmin kasveissa ja vihanneksissa, eikä sitä pidetä ihmisen normaalibakteeristoon kuuluvana lajina. Kantoja on kuitenkin kyetty eristämään ihmisten ulosteista ja emättimestä (katsaus: Hemme ja Focaud-Scheunemann 2004). Tämä oli ensimmäinen kerta, kun se löydettiin äidinmaidosta.

L. lactis -kantoja eristettiin tässä tutkimuksessa kahdesta äidinmaitonäytteestä. Kummatkin todettiin myöhemmin nisiinintuottajiksi. Myöhemmin Beasley ja Saris (2004) löysivät nisiiniä tuottavia *L. lactis* -kantoja 30 prosentista äidinmaitonäytteistä (n = 20). Syy tässä tutkimuksessa havaittuun harvinaisempaan esiintymisfrekvenssiin saattaa selittyä erilaisen kasvualustan käytöstä ja erilaisesta viljelymenetelmästä. Tässä tutkimuksessa kasvualustana oli MRS, kun taas Beasley ja Saris (2004) käyttivät M17G-kasvualustaa. Näyttäisi siis siltä, että M17G suosii MRS:ää paremmin laktokokkien kasvua.

1.3 Streptokokit

Str. salivarius (12 %) ja *Str. mitis* (5,9 %) olivat *Staph. epidermidis* -bakteerin jälkeen yleisimmin äidinmaidosta eristetyt bakteerilajit. Niiden tiedetään olevan vallitsevia lajeja vauvan suussa (Könönen 2000). Muita tässä tutkimuksessa löydettyjä oraalisiin streptokokkeihin kuuluvia normaalibakteeriston lajeja ovat *Str. parasanguinis*, *Str. peroris* ja *Str. oralis*. Oraalisia streptokokkeja on löydetty äidinmaidosta myös aiemmin (Eidelman ja Szilagy 1979, West ym. 1979), mutta tässä tutkimuksessa ne tunnistettiin ensimmäistä kertaa lajitasolle. Niiden ajatellaan siirtyvän rintamaitoon vauvan suusta imetyksen aikana (West ym. 1979).

Str. agalactiae, joka löytyi tässä tutkimuksessa yhdestä näytteestä, on edellisistä poiketen tunnettu taudinaiheuttaja. Se kuuluu beta-hemolyyttisiin streptokokkeihin ja aiheuttaa vastasyntyneillä vakavia tulehduksia, kuten verenmyrkytyksiä. Useimmiten tartunta tapahtuu synnytyskanavasta, sillä noin 10–30 % raskaana olevista naisista kantaa bakteeria emättimessään (Spellerberg 2000). Keskosina syntyneille bakteeri voi kuitenkin joissain harvoissa tapauksissa aiheuttaa tulehduksen myös äidinmaidon kautta (Godambe ym. 2005, Olver ym. 2000, Atkins ym. 1998, Bingen ym. 1992). Tässä tutkimuksessa mukana ollut vauva ja äiti, jonka rintamaidosta kyseinen bakteeri löydettiin, olivat kuitenkin terveitä.

1.4 Enterokokit

Enterokokkeja eristettiin satunnaisotannassa kolmen äidin maidosta. Näistä kahden maidossa *Ent. faecalis* oli vallitseva bakteeri. Ensimmäisen äidin maidosta löydettiin ainoastaan enterokokkeja: 12/13 isolaattia tunnistettiin *Ent. faecalis* -lajiksi ja kolmastoista isolaatti tunnistettiin vain sukutasolle, *Enterococcus* sp. -lajiksi. Toisen äidin maidossa *Ent. faecalis* -lajiin kuuluviksi tunnistettiin 9/15 isolaattia ja loput kuuluivat *Staph. epidermidis* -lajiin. Kokonaispesäkemäärät kyseisissä näytteissä olivat noin 3×10^3 pmy/ml ja 1×10^4 pmy/ml, mitkä olivat selvästi kaikista maitonäytteistä lasketun mediaanin (n. 6×10^2 pmy/ml) yläpuolella. Kolmannen äidin maidosta eristettiin vain yksi *Ent. faecalis* -kanta ja loput olivat stafylokokkeja ja streptokokkeja.

Enterokokkeja on aiemminkin löydetty äidinmaidosta (Eidelman ja Szilagyi 1979, Wright ja Feeny 1998), mutta niiden lajeja ei ole määritetty. Tämän tutkimuksen jälkeen ilmestyneessä artikkelissa Reviriego ym. (2005) löysivät 9/10 rintamaitonäytteestä runsaasti enterokokkeja ($> 10^3$ pmy/ml), jotka he tunnistivat RAPD-analyysillä *Enterococcus faecium* -kannoiksi. He totesivat, että kyseiset kannat eivät ole tautia-aiheuttavia, sillä niillä ei ole virulenssitekijöitä. Reviriegon ym. (2005) mukaan enterokokkien suuri määrä rintamaidossa voi osoittaa, että niillä on tärkeä biologinen rooli vauvan ensimmäisten elinkuukausien aikana. He aikovat jatkossa tutkia, kykenevätkö nämä enterokokit estämään taudinaiheuttajia ja onko niillä merkitystä vauvan suolistoon liittyvän imukudoksen kehittämisessä.

Mistä johtuvat erot enterokokkien esiintymisessä? Tässä tutkimuksessa ne olivat vallitsevia kahdessa näytteessä (n = 40), mutta Reviriegon ym. (2005) mukaan suurimmassa osassa äidinmaitonäytteitä (9/10). Myös lajimääritykset antoivat erilaiset vallitsevat lajit. Eroille on luultavasti useita selittäviä tekijöitä, joista yksi merkittävä on erilaisen kasvualustan käyttö (MRS vs. KAA). Toinen on imetysvaihe, sillä Reviriegon ym. (2005) ja Martinin ym. (2003) tutkimuksissa kaikki näytteet oli otettu neljän päivän kuluttua synnytyksestä. Tässä tutkimuksessa näytteet olivat eri vaiheista imetystä. Tässä tutkimuksessa toinen näytteistä, joissa enterokokit olivat vallitsevia, oli otettu noin puolen vuoden kuluttua ja toinen 9 päivän kuluttua synnytyksestä. Eroja äidinmaidon mikrobikoostumukseen voi aiheuttaa myös äidin ravinto, joka voi olla hyvinkin erilainen Espanjassa ja Suomessa. Ravinto vaikuttaa äidin suoliston ja emättimen bakteeristoon ja sitä kautta myös luultavasti äidinmaidon bakteerikoostumukseen.

1.5 Muut

Muita äidinmaidosta satunnaisotannalla eristettyjä bakteerilajeja olivat *Actinomyces odontolyticus* ja *Rothia mucilagenosus*, joiden tiedetään esiintyvän vauvan suussa alle puolen

vuoden iässä (Könönen 2000). Lisäksi tutkimuksessa eristettiin yhdestä näytteestä kaksi pesäkettä, jotka havaittiin mikroskopoimalla hiivoiksi.

2 Äidinmaidon bakteerien kyky estää taudinaiheuttajia

Tässä tutkimuksessa keskeisimpänä uutena löytönä havaittiin, että terveiden äitien rintamaidossa esiintyy varsin yleisesti *Staph. aureus*-, *Listeria innocua*- ja *Micrococcus luteus* -bakteerien kasvua hillitseviä mikrobeja (artikkelin (I) taulukot 2 ja 3 sekä taulukot IV.2 ja IV.3). On uusi ajatus, että äidinmaidon bakteereilla voisi olla merkitystä myös tulehdusten ehkäisyssä.

Yleisesti ajatus luontaisen bakteeriston hyödyllisyydestä taudinaiheuttajien ehkäisyssä ei ole uusi, vaan asia havaittiin alunperin jo yli sata vuotta sitten (historiakatsaus: Brook 1999). Normaalebakteeriston merkitystä ja kykyä estää tulehduksia tutkitaan nykyisin innokkaasti, sillä antibiooteille pyritään löytämään vaihtoehtoja resistenssiongelman lisääntyessä. Bakteriterapiasta, jossa taudinaiheuttajat pyritään korvaamaan "hyvillä" bakteereilla, toivotaan keinoa tulehdusten torjumiseen (katsaukset: Strauss 2000, Huovinen 2001, Reid ym. 2001, Brook 2005, Yan ja Polk 2004).

Tässä tutkimuksessa äidinmaidon bakteerien kyky estää *Staph. aureus* -bakteerin kasvua havaittiin sekä maljalla kasvaneista pesäkkeistä (pesäkeinhibitio, kappale III.2.1) että eristetyistä puhdasviljelmistä (kappale III.2.2). Jopa 90 prosentissa äidinmaidonäytteitä (n = 40) esiintyi kasvua hillitseviä (35/40) tai estäviä (16/40) pesäkkeitä. Satunnaisotannan isolaateista (n = 443) noin 22 % hillitsi ja 7 % esti *Staph. aureus* -bakteerin kasvua. *Strep. salivarius* -kannat, enterokokit ja laktobasillit inhiboivat erityisen yleisesti. Myös yleisimmän bakteerilajin, *Staph. epidermidis*, kannoista vajaa 20 % hillitsi ja 4 % esti *Staph. aureus* -bakteerin kasvua.

Äidinmaidosta kyettiin tässä tutkimuksessa eristämään yleisesti myös *L. innocua* - ja *M. luteus* -bakteerien kasvua hillitseviä bakteereita (taulukko IV.3). Kolmannes näytteistä (n = 141) sisälsi *L. innocua* -bakteeria ja kymmenesosa *M. luteus* -bakteeria hillitseviä bakteereita. Lisäksi testibakteerin kasvua voimakkaasti estäviä pesäkkeitä esiintyi muutamassa näytteessä. Inhibition perusteella eristetyistä isolaateista osa tunnistettiin jatkotutkimuksissa (taulukko IV.4). Suurin osa niistä kuului äidinmaidon vallitseviin bakteerilajeihin: *Staph. epidermidis*, *Str. salivarius* ja *Str. mitis*, mutta lisäksi tunnistettiin muutama *Lb. rhamnosus*-, *Str. peroris*-, *Str. parasanguinis*- ja *L. lactis* -kanta. Näistä osan inhibitiokyky katosi tai heikentyi toistuvissa jatkosiirrostuksissa. Parhaiten inhibitiokykynsä säilyttivät *Str. salivarius* -kannat MH13, MH14, MH65, MH69, *Str. peroris* MH201, *Staph. epidermidis* -kannat MH6, MH7, M928, *Ent. faecalis* -kannat M809, MH31 ja *L. lactis* MH27, MH34 (taulukot IV.5 ja IV.6). Jatkotutkimuksissa *L. lactis* MH27 ja MH34 -kantojen todettiin tuottavan nisiiniä.

Tämän tutkimuksen kuluessa myös muut tutkimusryhmät ovat kiinnostuneet äidinmaidon maitohappobakteereista. Esimerkiksi Espanjassa lanseerattiin tänä vuonna markkinoille äidinmaidosta eristetyillä probioottisilla laktobasilleilla fermentoituja hapanmaitotuotteita, joiden tavoittena on parantaa lasten puolustusjärjestelmän toimintaa.

3 Antibakteeriset yhdisteet

Bakteerit tuottavat monenlaisia antimikrobisia yhdisteitä, joilla ne estävät muiden, kilpailevien bakteerilajien kasvua. Tällaisia ovat mm. erilaiset hapot, sykliset dipeptidit (katsaukset: Niku-Paavola ym. 1999, Ström ym. 2002), vetyperoksidi ja bakteriosiinit (ks. kirjallisuusosan kappale 5). Tässä tutkimuksessa pyrittiin löytämään äidinmaidosta erityisesti bakteriosiineja tuottavia mikrobikantoja. Bakteriosiinit ovat erityisen kiinnostavia, sillä ne kestävät yleensä hyvin erilaisia ympäristöolosuhteita, ja niille on kaavailtu runsaasti käyttömahdollisuuksia elintarvikkeissa (katsaus: Chen ja Hoover, 2003) ja lääkkeinä (katsaus: Pag ja Sahl, 2002). Äidinmaidosta eristetyillä bakteriosiinintuottajilla voisi siten olla mahdollista käyttöä äidinmaidonkorvikkeissa estämässä patogeeneja ja niitä voitaisiin käyttää esimerkiksi rintatulehduksia estävässä nännyvoiteessa.

Tässä tutkimuksessa kuvattiin äidinmaidosta kaksi nisiiniä tuottavaa *L. lactis* -kantaa, ja kokeiltiin erilaisia menetelmiä äidinmaidon kantojen tuottamien bakteriosiinien konsentroimiseksi, puhdistamiseksi ja karakterisoimiseksi. Tutkimuksen edetessä törmättiin yhteen melko yleiseen bakteriosiinitutkimusten ongelmaan: bakteriosiinintuoton vähenemiseen ja sitä kautta inhibition heikkenemiseen laboratoriokasvatuksissa. Tämä johtunee siitä, että bakteriosiinintuotto riippuu erittäin voimakkaasti kasvuolosuhteista (Parente ja Ricciardi 1999). Koska laboratoriossa kasvuolosuhteet ovat väistämättä erilaiset kuin alkuperäisessä erityislähteessä, bakteriosiinintuotto voi toistuvissa siirrostuksissa heikentyä tai lakata kokonaan. Tässä tutkimuksessa monet kannoista, jotka alunperin estivät hyvin tehokkaasti testiorganismien kasvua, useamman siirrostuskerran jälkeen estivät enää hyvin heikosti tai eivät lainkaan. Tämä ilmiö haitsi kyseisten antimikrobisten yhdisteiden tunnistamista.

Useissa tutkimuksissa solujen bakteriosiinin tuoton on todettu riippuvan voimakkaasti kasvuolosuhteista (katsaukset: Parente ja Ricciardi 1999, Leroy ja Vuyst, 1999) ja tarvitsevan ympäristöstä niiden tuottoa herättäviä signaaleja. Yleensä tuotto on kiinni solutiheydestä (van der Ploeg 2005, Petersen ym. 2006). Tähän ns. quorum sensing -tyyppiseen geenisäätelyyn kuuluu solun ulkopuolelta signaaleja vastaanottava sensoriproteiini (histidiinikinaasi), joka siirtää signaalin solun sisäpuolelle kohdegeenien transkriptiota säätelevälle proteiinille. Usein signaalina toimii itse

bakteriosiini (autoinduktio) tai sen tyyppinen peptidi (van der Ploeg 2005). Jos signaalinvälitystä häiritään, bakteriosiinin tuotto lakkaa tai vähenee.

Tuotetun bakteriosiinin määrään ja laatuun voi vaikuttaa myös se, kasvaako bakteeri kiinteällä kasvualustalla vai nesteviljelmässä. Esimerkiksi *Streptococcus mutans* -bakteeri tuottaa enemmän bakteriosiinia maljalla, sillä bakteriosiinin tuotto, ja siihen kuuluva signaalijärjestelmä, liittyy kyseisellä bakteerilla biofilmin muodostukseen (van der Ploeg 2005). Myös tässä tutkimuksessa havaittiin selkeä ero malja- ja nesteviljelmien välillä. Useissa tapauksissa äidinmaidosta eristetyt bakteerit, etenkin streptokokit, tuottivat kasvaessaan maljalla selkeän inhibitiokehän, mutta nesteviljelmistä ei inhibitiota pystytty osoittamaan. Tosin kyseisissä tapauksissa ei bakteriosiinin tuottoa pystytty todistamaan, joten inhibitio saattoi johtua myös esimerkiksi hapon, vetyperoksidin tai muiden yhdisteiden tuotosta. Toisaalta, esimerkiksi *Str. mutans* UA159 -bakteerikannalta, jonka perimä on kokonaan sekvensoitu, on löydetty 12 oletettua bakteriosiinigeeniä kromosomista (van der Ploeg 2005) ja bakteriosiinien tuottoa pidetään hyvin yleisenä ilmiönä (Jenssen ym. 2006). Täten on varsin mahdollista, että myös jotkin äidinmaidosta eristetyistä streptokokeista ($n > 170$) kykenevät tuottamaan bakteeriosiineja.

3.1 Nisiinintuotto

Tässä tutkimuksessa löydettiin äidinmaidosta kaksi *L. lactis* -kantaa (MH27 ja MH34), jotka tuottivat nisiini-bakteriosiinia. Lisäksi Beasley ja Saris (2004) eristivät hieman tästä tutkimuksesta poikkeavalla menetelmällä seitsemän nisiiniä tuottavaa *L. lactis* -kantaa kuudesta rintamaitonäytteestä ($n = 20$). Beasley ym. (2003) fermentoivat yhdellä äidinmaidon *L. lactis* -kannoista soijamaidosta pehmeää hapanmaitotuotetta, joka säilyi hyvin ja osoittautui aistinvaraisessa arvioinnissa mauultaan miellyttäväksi. Äidinmaidon laktokokkikannoilla saattaisi siten olla käyttöä elintarvikkeiden valmistuksessa.

3.2 Proteinaasikäsitteltyjen kasvuliemisupernatanttien estovaikutukset

Tässä tutkimuksessa eristetyistä äidinmaidon *Staph. epidermidis* -kannoista neljän kannan, M926, M928, MH6 ja MH7, kasvuliemen proteinaasi K- tai trypsiinikäsittelyt heikensi sen inhibitiokykyä *M. luteus* ATCC 10240 -kantaa vastaan (taulukko IV.6). Tämä viittaa siihen, että kyseiset kannat tuottivat kasvualustansa bakteriosiinia tai jotain muuta proteiiniperäistä inhiboivaa yhdistettä. Aiempien tutkimusten perusteella *Staph. epidermidis* -bakteerin tiedetään tuottavan useita erilaisia bakteriosiineja, kuten epidermiini (2164 Da), (Val1, Leu6)-epidermiini (2151 Da), pep5 (3488 Da), episidiini 280 (3133 Da) ja epilansiini K7 (3032 Da) (kirjallisuusosan kappale 5).

Proteinaasi K tai trypsiinikäsittelyt eivät heikentäneet *Ent. faecalis* MH31 ja MH41 -kantojen kasvuliemien estokykä (taulukko IV.6), ei myöskään katalaasikäsittely, joten vetyperoksidin tuotostakaan tuskin oli kyse. Lieneekin mahdollista, että kyseiset kannat tuottavat happoja tai pienimolekyylisiä antimikrobisia yhdisteitä, mikä jää jatkossa selvitettäväksi. On myös mahdollista, että kannat tuottavat bakteriosiinia, joka ei hajoa kyseisillä proteinaaseilla.

Katalaasikäsittely heikensi *Str. salivarius* MH65 -kannan inhibitiota, mikä osoittaa vetyperoksidin tuottoa. Toisella testatulla *Str. salivarius* -kannalla, M13, katalaasikäsittely ei vähentänyt inhibitiota, mutta ei myöskään proteinaasikäsittely.

Proteinaasikäsittelyä kokeiltiin myös nisiiniä tuottavalla *L. lactis* LAC280 -vertailukannalla. Proteinaasi K, mutta ei trypsiini, hävitti kokonaan inhibitiovaikutuksen. Katalaasikäsittely ei vähentänyt inhibitiota.

3.3 Proteiinigeelielektroforeesi

Bakteriosiineja karakterisoitaessa usein käytetty keino on ajaa väkevöityä kasvulientä trisiini-SDS-PAGE-geelissä, jolloin bakteriosiini erottuu kokonsa perusteella, ja jälkeensä valaa geelin päälle testibakteeri. Tällöin voidaan osoittaa suoraan geelistä testiorganismien kasvun estyminen ja saadaan arvio bakteriosiinin koosta. Kyseinen menetelmä on suosittu apukeino vielä nykyäänkin (mm. Batdorj ym. 2006, Deraz ym. 2005, de Kwaadsteniet ym. 2005, Xiraphi ym. 2005, Kemperman ym. 2003).

Tässä tutkimuksessa äidinmaidosta eristettyjen *Staph. epidermidis* MH6-, MH7- ja M928 -bakteerikantojen resiinillä konsentroidussa kasvuliemessä näkyi trisiini-SDS-PAGE:ssa kooltaan noin 3 kDa:n kokoiset erityisen voimakkaat juovat (kuva IV.2), jotka eivät olleet peräisin kasvuliemestä. Kooltaan ne siten vastaavat epilansiinia (3032 Da) tai episidiinia (3133 Da). Resiini konsentroi periaatteessa valikoimatta kaikki kasvuliemen proteiinit. Myöhemmin, eristettäessä bakteriosiineja erityisellä Yangin ym. (1992) kuvaamalla pH-menetelmällä, kasvuliemistä konsentroitui kuitenkin aivan eri kokoluokkaa olevia proteiineja, arviolta 4 - 5 kDa:n kokoisia (kuva IV.3). Tällöin kuitenkin kasvuliemeen ja soluihin jäi voimakas noin 3 kDa:n juova, joka ei konsentroitunut kyseisellä menetelmällä. Näiden tulosten perusteella ei kuitenkaan voida osoittaa bakteriosiinin tuottoa, sillä inhibitiota ei pystytty osoittamaan luotettavasti ja toistettavasti geelistä.

Nisiiniä tuottavien *L. lactis* N8- ja LAC280-referenssikantojen antibakteerinen estovaikutus havaittiin usein, mutta ei aina, edellä kuvatulla menetelmällä suoraan geelistä (kuva IV.4). Sen sijaan puhdas nisiini (Ambicin N) aiheutti aina odotetulla tavalla testiorganismien kasvun estymisen geelistä (kuva IV.4). Ongelmana huonossa inhibition näkymisessä toisinaan oli luultavasti bakteriosiinin alhainen pitoisuus. Sama voi olla syynä myös siihen, ettei *Staph. epidermidis* -

kannoista löydetty inhibitiota tällä menetelmällä. Toisaalta myöskään kaikki bakteriosiinit eivät kestä geelijossa käytettyjä denaturoivia olosuhteita, mikä voi myös selittää inhibition puuttumisen (Kemperman ym. 2003).

3.4 Väkevöinti ja HPLC

Uusia bakteriosiineja karakterisoitaessa raakauutteet ensin konsentroidaan ja esipuhdistetaan, sitten bakteriosiinit eristetään mahdollisimman puhtaiksi HPLC-kromatografialla, määritetään molekyylipaino massaspektrometrilla (MS) ja mahdollisesti sekvensoidaan N-terminaalisella aminohapposekvensoinnilla (Batdorj ym. 2006, Martin-Platero ym. 2006, Xiraphi ym. 2005, de Kwaadsteniet ym. 2005, Ghrairi ym. 2005). Lisäksi yleensä testataan puhdistetun tai osittain puhdistetun bakteriosiinin aktiivisuus eri bakteerikantoja vastaan sekä stabiilisuus (kuumuus, pH, proteinaasit, detergentit). Tosin aina nykypäivänäkään eivät bakteriosiinien karakterisoinnit ole näin perusteellisia. Esimerkiksi Sharma ym. (2006) ainoastaan väkevöivät bakteriosiinin ammoniumsulfaattisaostamalla, dialysoivat, ja tutkivat suoraan antimikrobista aktiivisuutta erilaisissa tilanteissa (pH, proteinaasit, lämpökäsittelyt) maljakokeilla.

Tässä työssä tutkittiin alustavasti bakteriosiinien väkevöimistä ja puhdistamista. *Staph. epidermidis* MH7 - ja *Ent. faecalis* M809 -kantojen kasvuliemistä väkevöitiin ja puhdistettiin bakteriosiineja C18-kiinteäfaasimenetelmällä, joka perustuu bakteriosiinien C-terminuksen hydrofobisuuteen. Ne tarttuvat kiinni C18-pylvääseen, jossa ne voidaan pestä ja lopulta irrottaa liuottimen avulla. Tällä tavoin kasvuliemi esipuhdistettiin HPLC:tä varten. *Staph. epidermidis* MH7 - tai *Ent. faecalis* M809 -kantojen näytteissä ei kuitenkaan näkynyt selkeää kasvuliemen antamasta tausta erottuvaa piikkiä (kuvat IV.5 ja IV.6). Syitä voi olla monia, kuten: bakteriosiini ei tarttunut C18-pylvääseen tai HPLC-pylvääseen tai bakteriosiinin määrä oli alun perinkin liian pieni kasvuliemessä ja taustaa oli suhteessa liikaa.

Nisiiniä tuottavalla *L. lactis* LAC280 -referenssikannalla yllä kuvattu menetelmä toimi, vaikka sitä voisi vielä parantaa. Preparatiivisessa HPLC-ajossa kerättiin estovaikutuksen etsintään maljalla maljalla. Tällä tavoin löydettiin aktiiviset nisiiniä sisältävät fraktiot, joita vastasi kromatogrammissa leveä piikki (kuva IV.7). Nisiinistä aiheutuva piikki ei erotu, mikä voi johtua preparatiivisessa ajossa käytetystä suuresta näytemäärästä ja mukana olevista epäpuhtauksista. Jatkossa näytettä kannattaisi puhdistaa lisää ja injektoida pienempi määrä HPLC-pylvääseen analyyttistä ajoa varten.

Ammoniumsulfaattisaostus on perinteinen tapa konsentroida proteiineja, ja sitä on käytetty hyvin yleisesti bakteriosiinien konsentroinnissa (mm. Xiraphi ym. 2005, de Kwaadsteniet ym. 2005). Ammoniumsulfaattisaostuksessa nähtiin selvä ero pelkän kasvualustan ja *Str. peroris* MH201 -kannan kasvuliemen välillä, mikä osoittaa, että kyseinen isolaatti on muokannut kasvualustaa

kasvaessaan (kuva IV.8). Kyseinen kanta on mielenkiintoinen, sillä *Str. peroris* -laji kuvattiin vuonna 1998 (Kawamura ym. 1998), eikä siltä ole vielä toistaiseksi löydetty bakteriosiineja. Vielä näiden tulosten perusteella ei kuitenkaan voida tehdä päätelmiä bakteriosiinintuotosta. Jatkossa pitäisi tehdä preparatiivinen HPLC-ajo, kerätä jakeita ja testata niiden kyky estää testibakteerin kasvua. Vasta siten nähdään mikä HPLC-eluutioprofiilissa näkyvä piikki vastaa mahdollista bakteriosiinia.

Bakteriosiinia tuottavilla *Lb. curvatus* - ja *Lb. plantarum* -vertailukannoilla ammoniumsulfaattisaostus ei tuottanut kasvualustasta poikkeavia jakeita (kuva IV.9). Kromatogrammissa näkyvä leveä piikkiklusteri oli eri muotoinen laktobasillikasvatuksissa kasvuliemeen verrattuna. HPLC-olosuhteita olisi optimoitava ja/tai näytettä esipuhdistettava, jotta erottelu paranisi. Jatkossa on myös kerättävä fraktioita, joista nähdään, missä kohtaa bakteriosiinit eluoituvat.

Näitä alustavia HPLC-menetelmällä saatuja tuloksia voidaan käyttää apuna jatkotutkimuksia suunnitellessa. Koska C18-kiinteäfaasiuutolla ei saatu tutkittujen isolaattien kasvuliemistä väkevöityä proteiineja, voisi ammoniumsulfaattisaostus suuresta kasvuliemilavuudesta olla parempi vaihtoehto. Sitä seuraisivat esipuhdistus C18-kiinteäfaasiuutolla ja sitten vasta HPLC-ajo, kuten Ghrairi ym. (2005) ovat tehneet. Ammoniumsulfaatti saostaa periaatteessa valikoimatta kaikki proteiinit ja C18-kiinteäfaasiuutolla päästään eroon osasta kasvualustan epäpuhtauksista.

Jatkossa tulee keskittyä menetelmien, väkevöinnin, esipuhdistuksen ja ajo-olosuhteiden optimointiin bakteriosiineja tuottavista referenssikannoista tavoitteena kromatogrammissa bakteriosiinipiikki, jonka aktiivisuus pystytään toteamaan. Tämän jälkeen voidaan kokeilla varsinaisten äidinmaitokantojen kasvuliemien analysointia. Tarkemmat ehdotukset jatkotutkimuksista on esitetty jäljempänä.

V Johtopäätökset

Tämän tutkimuksen perusteella äidinmaidossa esiintyy yleisesti eräiden taudinaiheuttajien kasvua estäviä tai hillitseviä bakteereita. Satunnaisotannassa 90 prosentissa äidinmaitonäytteistä ($n = 40$) esiintyi *Staphylococcus aureus* –bakteerin kasvua hillitseviä tai estäviä pesäkkeitä. *Listeria innocua* -bakteeria inhiboivia isolaatteja eristettiin kolmanneksesta ja *Micrococcus luteus* –bakteeria inhiboivia kymmenesosasta näytteitä ($n = 141$).

Tutkimuksen perusteella vauva, joka nauttii päivittäin noin 800 ml rintamaitoa, saa sen mukana arviolta $8 \times 10^4 - 8 \times 10^6$ bakteeria. Rintamaidosta tavallisimmin eristetyt bakteerilajit olivat iholle tyypillisiä stafylokokkeja ja oraalisia streptokokkeja. Niitä esiintyy yleisesti myös rintaruokitun vauvan ulosteessa (Kirjavainen ym. 2001, Favier ym. 2002).

Yleisin rintamaitonäytteistä tunnistettu bakteerilaji oli *Staph. epidermidis*, joka on myös aiemmissa tutkimuksissa havaittu rintamaidon valtalajiksi (Caroll ym. 1979, Eidelman ja Szilagyi 1979, West ym. 1979). Tässä tutkimuksessa se edusti puolta kaikista satunnaisotannalla eristetyistä kannoista. Viidennes kannoista hillitsi tai esti *Staph. aureus* –bakteerin kasvua.

Streptokokeista tässä tutkimuksessa yleisimmät lajit olivat *Streptococcus salivarius* ja *Streptococcus mitis*, joiden tiedetään olevan vallitsevia lajeja vauvan suussa (Könönen 2000). Lähes puolet *Str. salivarius* –kannoista hillitsi tai esti *Staph. aureus* –bakteerin kasvua.

Aidinmaidossa esiintyy myös perinteisiä elintarvikkeiden maitohappobakteereita, joita on tämän tutkimuksen kuluessa löydetty myös rintamaidosta myös muissa maissa (Martin ym. 2003 ja 2006, Sinkiewicz ja Nordström 2005). Tässä tutkimuksessa rintamaitonäytteistä eristettiin *Lactobacillus rhamnosus*-, *Lactobacillus crispatus*-, *Lactobacillus gasseri*-, *Leuconostoc mesenteroides*- ja *Lactococcus lactis* -bakteerikantoja. Lähes kaikki kannat hillitsivät *Staph. aureus* -testibakteerin kasvua. Koska maitohappobakteereita pidetään yleisesti turvallisina käyttää, niitä voitaisiin mahdollisesti hyödyntää elintarvikkeissa ja probiootteina esimerkiksi äidinmaidonkorvikkeissa.

Rintamaidosta eristettyjen *L. lactis* -isolaattien todettiin tuottavan bakteriosiinia, nisiiniä, jonka tiedetään estävän monia taudinaiheuttajia. Sitä käytetään myös yleisesti estämässä elintarvikkeiden pilaantumista (Delves-Broughton ym. 1996). Näillä laktokokkikannoilla voisi mahdollisesti olla käyttöä elintarviketeollisuudessa (Beasley ym. 2003).

Myös useiden muiden rintamaidosta eristettyjen bakteerikantojen todettiin tuottavan antibakteerisia yhdisteitä, joiden karakterisoimiseksi tehtiin alustavia kokeita. Tutkimista vaikeutti antibakteerisen yhdisteen tuoton hiipuminen puhdasviljelmissä ajan myötä. Trisiini-SDS-PAGE-geelissä äidinmaidon *Staph. epidermidis* -bakteerikantojen (MH6, MH6, M928) todettiin tuottavan kasvualustaan runsaasti noin 3000 Da:n kokoista molekyyliä, mutta inhibitiota ei pystytty osoittamaan geelistä. Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (HPLC) saatiin *L. lactis* LAC280

-referenssikannan tuottama nisiini osoitettua jakeiden aktiivisuuden perusteella, mutta äidinmaitokantojen tuottamien antibakteeristen yhdisteiden osoittaminen vaatii vielä menetelmien optimointia. Koska kasvuolosuhteet vaikuttavat keskeisesti bakteriosiinien tuottoon (Parente ja Ricciardi 1999), myös niitä tulisi jatkossa muokata bakteriosiinin tuottoa suosiviksi.

VI Ehdotuksia jatkotutkimuksille

1 Tähän tutkimukseen liittyvät jatkotutkimukset

Tätä tutkimusta voitaisiin jatkaa kokeilemalla ensin bakteriosiinien konsentroitua ja osittaista puhdistusta seuraavasti: ensin konsentroida isosta tilavuudesta (esim. 500 ml) portaittaisella ammoniumsulfaattisaostuksella (esimerkiksi 50%, 60%, 70% ja 80%), sitten puhdistus C18-kiinteäfaasiuutolla, josta lopuksi näyte HPLC-ajoon. Joka vaiheessa tulee tarkistaa, että bakteriosiinin aktiivisuus säilyy. Puhdistuksissa käytetyt olosuhteet voivat aiheuttaa bakteriosiinin denaturoitumisen, joten aktiivisuuden säilymistä tulee seurata vaihe vaiheelta.

HPLC:ssä käytössä ollut C8-pylväs (Zorbax Eclipse XDB-C8), ajo-olosuhteet ja liuokset toimivat hyvin proteiinistandardeille (ei kuvaa) ja nisiini eluoitui sopivan retentioajan (11 - 12 minuuttia) kuluessa (kuva IV.7), joten niitä voitaisiin pitää aluksi samoina. Preparatiivisesta HPLC-ajosta saaduista fraktioista voitaisiin tämän jälkeen tutkia bakteriosiiniaktiivisuus tässä tutkimuksessa kuvatulla tavalla. Menetelmä tulisi ensin saada kokonaisuudessaan luotettavasti toimimaan bakteriosiinia tuottavilla referenssikannoilla *L. lactis* N8, LAC280 sekä *Lb. curvatus* SAA263 ja *Lb. plantarum* SAA260. Sen jälkeen voitaisiin tutkia äidinmaidosta eristetyt isolaatit, joista erityisen kiinnostavia ovat *Staph. epidermidis* MH6, MH7, M926 ja M928 sekä *Ent. faecalis* M809 ja *Str. peroris* M201. Näiden äidinmaitokantojen kasvualustaa ja -olosuhteita pitäisi kuitenkin ennen jatkokokeita optimoida bakteriosiinintuottoa ajatellen ja testata inhibitiota eri testiorganismeja vastaan. Nyt osa kyseistä isolaateista saa aikaan huomattavasti heikomman estovyöhykkeen testiorganismia vastaan kuin alunperin eli antimikrobisen yhdisteen tuotto on heikentynyt.

Kun HPLC-kromatogrammista saadaan tunnistettua bakteriosiinia sisältävät jakeet aktiivisuutensa perusteella, voidaan ne kerätä ja yhdistää. Tämän jälkeen näytteet voidaan ajaa HPLC:n kautta massaspektrometriin, jossa niiden molekyylipaino voidaan määrittää. Puhdistetusta bakteriosiinista saadaan myös näyte aminoterminaliseen sekvensointiin.

Edellä kuvatulla tavalla puhdistetun bakteriosiinin aktiivisuutta eri bakteerikantoja vastaan voidaan tämän jälkeen tarkastella maljainhibitiotesteillä. Lisäksi voidaan tutkia bakteriosiinin

stabiilisuus eli kuinka hyvin se kestää kuumuutta, erilaisia pH-olosuhteita sekä erilaisia proteinaaseja ja detergenttejä.

2 Laajemmin aihepiiriin liittyviä jatkotutkimusaiheita

Koska tässä tutkimuksessa todettiin, että äidinmaidossa pääosa bakteereista on stafylokokkeja ja streptokokkeja, jatkossa olisi hyödyllistä tutkia, mikä juuri näiden bakteerien merkitys on puolustusjärjestelmän kehittymiselle, ja voitaisiinko niitä käyttää hyväksi probiootteina. Ongelmana streptokokkien ja stafylokokkien hyödyntämisessä kuitenkin on niiden mahdollinen patogeenisuus, joten probioottinen käyttö vaatii tarkkoja tutkimuksia kantojen turvallisuudesta.

Äidinmaidon bakteereilla saattaa olla merkitystä myös "siedättäjinä" allergioiden ehkäisyssä. Rintamaitoa nauttineilla vauvoilla on nimittäin useissa tutkimuksissa todettu esiintyvän vähemmän allergioita kuin korvikeruokituilla, mutta syytä tähän ei ole vielä pystytty selvittämään (Katsaukset: Friedman ja Zeiger 2005, Michaelsen 2005). Hygienieoria, jonka mukaan altistuminen mikrobeille ja infektiot vähentävät allergioita (Katsaus: Friedman ja Zeiger, 2005), voisi osaltaan selittää äidinmaidon allergioita vähentävää vaikutusta. Vauva saa maidosta päivittäin huomattavan mikrobiannoksen. Kirjavainen ym. (2001) havaitsivat, että erityisesti streptokokkien ja muiden grampositiivisten bakteerien runsaampi esiintyminen vauvan suolistossa oli tyypillistä terveelle vauvalle verrattuna allergioista kärsivään vauvaan. Kyseiset bakteeriryhmät ovat myös äidinmaidon valtalajeja.

VII Kiitokset

Tämä tutkimus tehtiin Helsingin yliopistossa Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksen Mikrobiologian osastolla. Kiitos laitokselle hyvästä työympäristöstä ja rahoittajille työn mahdollistamisesta: Viikki graduate school for biosciences -tutkijakoululle (VGSB), Helsingin yliopiston tutkimusrahastolle, Suomen Akatemialle, Jenny ja Antti Wihurin säätiölle, sekä Walter Ehrströmin säätiölle matka-apurahasta. VGSB:n tutkijakoordinaattorille Eeva Sieville ja Nina Sarikselle kiitos sympaattisesta ohjauksesta opintoasioissa, sekä mielenkiintoisten kurssien ja luentojen organisoinnista.

Kiitokset ohjaajalleni professori Per Sarikselle rohkaisevasta ohjauksesta, mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta sekä inhimillisestä ja positiivisesta asenteesta. Sain sinulta paljon visioita ja uusia ideoita. Kiitokset professori Mirja Salkinoja-Saloselle kannustavista neuvoista kirjoitusvaiheessa sekä arvokkaista kriittisistä kommentteista kirjoittaessani tutkimusartikkelia: mestarilta oli hieno saada oppia. Akatemiaprofessori Kaarina Sivoselle kiitokset rakentavista keskustelutuokioista. Kiitokset yliopistonlehtori Pirjo-Nikula Ijäkselle hyvistä kommentteista työhön liittyen, opastuksesta proteiinimenetelmissä ja yhteisistä bussimatkoista.

Tutkimukseni onnistuminen riippui täysin vapaaehtoisten äitien avusta. Lämpimät kiitokset kaikille tutkimukseen osallistuneille, Imetyksen tuki ry:lle, Kauhavan ja Helsingin Itäkeskuksen neuvoloille sekä HYKSin äidinmaitokeskukselle. Kiitokset Hemen Ibrahimille, Anne-Marie Hollandille ja Ossian Sarikselle erinomaisesta teknisestä avusta. Kiitos Soile Tynkkyselle (Valio Ltd.) RAPD-analyysistä. Kiitokset Taina Lundellille ja Pauliina Lankiselle avusta proteiinien puhdistuksen suunnittelussa, neuvoista opintoasioissa, sekä kivoista keskustelutuokioista: teissä on paljon positiivista naisenergiaa. Kiitokset Matti Wahlstenille ja Jouni Jokelalle HPLC ja MS –opastuksesta, lämpimästä työilmapiiiristä, sekä mielenkiintoisista syvällisistä keskusteluista. Jään niitä kaipaamaan.

Kiitokset kaikille entisille ja nykyisille maitohappobakteeriryhmän sekä Mikrobiologian osaston työtovereille hyvästä työilmapiiiristä. Erityiskiitokset Janetta Hakovirrälle ja Minna Peltolalle hyvistä kommentteista kirjoitusvaiheessa, kahvihetkistä ja kivoista muistoista. Jatkakaahan lenkkeilyä! Kiitokset avusta ja mukavista yhteisistä hetkistä Petri Novakille (keep on rocking), Titta Manniselle (kannattaa seurata unelmiaan), Timo Takalalle (kiitos tärkeistä keskusteluista), Justus

Reunaselle (se kakku vei sydämeni), Sara Vaskiolle (meissä on mammaenergiaa), Riitta Saastamoiselle (teit oloni kotoisaksi), sekä Anu Surakalle & Mirkka Kotiaholle (pidetäänhän jatkossakin syöminkejä). Kiitos Outi Niemenmaalle, Leena Steiningerille ja Hannele Tukiaiselle ystävällisestä avusta monelaisten byrokratian solmujen aukomisessa, sekä Tuula Kynäslahdelle ja Tarja Grönroosille korvaamattomasta työstä laboratoriohengettäjinä. Haluan myös kiitollisuudella mainita henkilöt, joilta ole oppinut paljon opiskelu- ja jatkotutkintovaiheessa mikrobiologiasta, professori Seppo Niemelän, lehtori Kristina Lindströmin, dosentti Maarit Niemen ja professori Walter Zumftin.

Kiitos päätoimittaja Olli-Pekka Tiaiselle ja toimituspäällikkö Heli Väyryselle joustavuudesta, jota ilman tämä työ olisi jäänyt roikkumaan puolivalmiina vielä pidemmäksi aikaa. Myötämielisyytenne ansiosta sain urakan saatettua loppuun.

Kiitos vanhemmilleni Marja-Leenalle ja Martille rohkaisusta ja tuesta, sekä minua matkan varrella kannustaneille ystävilleni, Mika-veljelleni ja muille sukulaisille.

Rakkaimmat kiitokseni haluan osoittaa perheelleni. Aviomiehelleni Terolle kiitos yhteisestä matkasta, rakkaudesta ja tuesta. Yhdessä selviämme sekä ylä- että alamäistä. Rakkaille tyttärilleni, Siljalle ja Elisalle, kiitos ihanista yhteisistä hetkistä, jotka irrottavat työhuolista ja laittavat asiat oikeaan tärkeysjärjestykseen.

VIII Viitteet

Ajusi, J.D., Onyango, F.E., Mutanda, L.N. ja Wamola. 1989. Bacteriology of unheated expressed breast milk stored at room temperature. East. Afr. Med. J. 66(6):381 (abstrakti).

Almroth, S.G. 1978. Water requirements of breast-fed infants in a hot climate. Am. J. Clin. Nutr. 31(7):1154-7 (abstrakti).

Atkins, J.T., Heresi, G.P., Coque, T.M. ja Baker, C.J. 1998. Recurrent group B streptococcal disease in infants: Who should receive rifampin? J. Pediatr. 132(3 Pt 1):537-9.

Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Kirjassa: Salminen, S., von Wright, A. ja Ouwenhand, A. (ed.), Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects, third edition. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Metro, F., Prevost, H., Chobert, J.M. ja Haertle, T. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J. Appl. Microbiol. 101(4):837-48.

Bazarbachi, A., Ghez, D., Lepelletier, Y., Nasr, R., de The, H., El-Sabban, M.E. ja Hermine, O. 2004. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. Lancet Oncol. 5(11):664-72.

Beasley, S.S. ja Saris, P.E. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Appl. Environ. Microbiol. 70(8):5051-3.

Beasley S.S., Tuorila, H. ja Saris, P.E. 2003. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol. 81:159-62.

Behari, P., Englund, J., Alcasid, G., Garcia-Houchins, S. ja Weber, S.G. 2004. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 25(9):778-80.

Bhunia, A.K. ja Johnson, M.G. 1992. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. Lett. Appl. Microbiol. 15(1):5-7.

Bingen, E., Denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Aujard, Y., Brahimi, N., Geslin, P. ja Elion, J. 1992. Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. J. Infect. Dis. 165(3):569-73.

Blech, H., Friebe, K. ja Krause, W. 2004. Inflammation of Montgomery Glands. Acta Dermato-Venereologica 84(1): 93 - 94.

Boediman, D., Ismail, D., Iman, S., Ismangoen ja Ismadi, S.D. 1979. Composition of breast milk beyond one year. J. Trop. Pediatr. Environ. Child. Health. 25(4):107-10 (abstrakti).

- Boo, N.Y., Nordiah, A.J., Alfizah, H., Nor-Rohaini, A.H. ja Lim, V.K. 2001. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. *J. Hosp. Infect.* 49(4):274-81.
- Brook I. 1999. Bacterial interference. *Crit. Rev. Microbiol.* 25(3):155-72.
- Brook, I. 2005. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 133(1):139-46.
- Burton, J.P., Wescombe, P.A., Moore, C.J., Chilcott, C.N. ja Tagg, J.R. 2006. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4):3050-3.
- Canfield, L.M., Hopkinson, J.M., Lima, A.F., Silva, B. ja Garza, C. 1991. Vitamin K in colostrums and mature human milk over the lactation period--a cross-sectional study. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(3):730-5.
- Cardiff, R.D. ja Wellings, S.R. 1999. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 4(1):105-122.
- Carroll, L., Osman, M., Davies, D.P. ja McNeish, A.S. 1979. Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. *Lancet* 2(8145):732-3.
- Castellano, P. ja Vignolo, G. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2):194-9.
- Chen, H. ja Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety* 2:82-100.
- Chen, T.L., Thien, P.F., Liaw, S.C., Fung, C.P. ja Siu, L.K. 2005. First report of *Salmonella enterica* serotype panama meningitis associated with consumption of contaminated breast milk by a neonate. *J. Clin. Microbiol.* 43(10):5400-2.
- Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S. ja Gabrielli, O. 2004. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *J. Clin. Gastroenterol.* 38(6 Suppl):S80-3.
- Cotter, P.D., Hill, C. ja Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(10):777-88.
- Cotter, P.D., Hill, C. ja Ross, R.P. 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 1–2 doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
- Crispie, F., Twomey, D., Flynn, J., Hill, C., Ross, P. ja Meaney, W. 2005. The lantibiotic lactacin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 72(2):159-67.
- Darby, M.K. ja Loughhead, J.L. 1996. Neonatal nutritional requirements and formula composition: a review. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 25(3):209-17.

- Dawson, R.M.C, Elliott, D.C., Elliott, W.H. ja Jones, K.M. 1969. Data for biochemical research, 2. painos. Oxford University Press, Oxford, England.
- de Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. ja Dicks, L.M. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105(3):433-44.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. ja Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69(2):193-202.
- Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedstrom, M., Andersson, M.M. ja Mattiasson, B. 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Biotechnol.* 117(4):343-54.
- Donowitz, L.G., Marsik, F.J., Fisher, K.A. ja Wenzel, R.P. 1981. Contaminated breast milk: A source of *Klebsiella* bacteremia in a newborn intensive care unit. *Rev. Infect. Dis.* 3(4):716-20.
- Dorea, J.G. 2000a. Breast milk calcium and phosphorus concentrations. *Nutrition* 16(2):146-7.
- Dorea, J.G. 2000b. Iron and copper in human milk. *Nutrition* 16(3):209-20.
- Dorea, J.G. 2000c. Magnesium in human milk. *J. Am. Coll. Nutr.* 19(2):210-9.
- Dorosko, S.M. 2005. Vitamin A, mastitis, and mother-to-child transmission of HIV-1 through breast-feeding: current information and gaps in knowledge. *Nutr. Rev.* 63(10):332-46.
- Eidelman, A.I. ja Szilagyi, G. 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstet. Gynecol.* 53(5):550-2.
- el-Mohandes, A.E., Picard, M.B., Simmens, S.J. ja Keiser, J.F. 1997. Use of human milk in the intensive care nursery decreases the incidence of nosocomial sepsis. *J. Perinatol.* 17(2):130-4 (abstrakti).
- el-Mohandes, A.E., Keiser, J.F., Johnson, L.A., Refat, M. ja Jackson, B.J. 1993a. Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery: relationship to human milk use and systemic sepsis. *Am. J. Infect. Control.* 21(5):231-4.
- el-Mohandes, A.E., Schatz, V., Keiser, J.F. ja Jackson, B.J. 1993b. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am. J. Infect. Control.* 21(5):226-30.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. ja Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(1):85-106.
- Fendrick, J.L., Raafat, A.M. ja Haslam, S.Z. 1998. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3(1):7-22.
- Field, C.J. 2005. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* 135(1):1-4.

- Filteau, S. 2003. The influence of mastitis on antibody transfer to infants through breast milk. *Vaccine* 21(24):3377-81.
- Fontana, M.B., de Bastos Mdo, C. ja Brandelli, A. 2006. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Curr. Microbiol.* 52(5):350-3.
- Ford, J.E., Zechalko, A., Murphy, J. ja Brooke, O.G. 1983. Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch. Dis. Child.* 58(5):367-72.
- Fortunov, R.M., Hulten, K.G., Hammerman, W.A., Mason, E.O. Jr. ja Kaplan, S.L. 2006. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in term and near-term previously healthy neonates. *Pediatrics* 118(3):874-81.
- Franz, C.M. ja Holzapfel, W.H. 2004. Genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. Kirjassa: Salminen, S., von Wright, A. ja Ouwenhand, A. (ed.), *Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects*, third edition. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Friedman, N.J. ja Zeiger, R.S. 2005. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115(6):1238-48.
- Fujino, T. ja Nagata, Y. 2000. HTLV-I transmission from mother to child. *J. Reprod. Immunol.* 47(2):197-206.
- Galan, J.E. ja Curtiss, R. 3rd. 1991. Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59(9):2901-8.
- Gastelum, D.T., Dassey, D., Mascola, L. ja Yasuda, L.M. 2005. Transmission of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from breast milk in the neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24(12):1122-4.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. ja Manai, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 105(3):389-98.
- Gill, J.J., Sabour, P.M., Gong, J., Yu, H., Leslie, K.E. ja Griffiths, M.W. 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56(3):471-81.
- Godambe, S., Shah, P.S. ja Shah, V. 2005. Breast milk as a source of late onset neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24(4):381-2.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L. ja Salminen, S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 37(1):121-8.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. ja Ross, R.P. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98(6):1316-25.

- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. ja Berjeaud, J.M. 2000. Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4):1744-1748.
- Hain, T., Steinweg, C. ja Chakraborty, T. 2006. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *J Biotechnol.* 126(1):37-51.
- Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G. ja Welling, G.W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30(1):61-7.
- Hasselbalch, H., Engelmann, M.D., Ersboll, A.K., Jeppesen, D.L. ja Fleischer-Michaelsen, K. 1999. Breast-feeding influences thymic size in late infancy. *Eur. J. Pediatr.* 158(12):964-7.
- Heikkilä, M.P. ja Saris, P.E. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95(3):471-8.
- Hemme, D. ja Foucaud-Scheunemann, C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14:467-494.
- Hickman, M.E., Rench, M.A., Ferrieri, P., Baker, C.J. 1999. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104(2 Pt 1):203-9.
- Huebner, J. ja Goldmann, D.A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50:223-36.
- Huffman, S.L., Zehner, E.R. ja Victora, C. 2001. Can improvements in breast-feeding practices reduce neonatal mortality in developing countries? *Midwifery* 17(2):80-92.
- Humphrey, J. ja Iliff, P. 2001. Is breast not best? Feeding babies born to HIV-positive mothers: bringing balance to a complex issue. *Nutr. Rev.* 59(4):119-27.
- Huovinen, P. 2001. Bacteriotherapy: the time has come. *BMJ* 323(7309):353-4.
- Jack, R.W. ja Jung, G. 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4(3):310-7.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. ja Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59(2):171-200.
- Jenssen, H., Hamill, P. ja Hancock, R.E. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3):491-511.
- Jimenez, E., Fernandez, L., Marin, M.L., Martin, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J. ja Rodriguez, J.M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51(4):270-4.
- Jones, C.A. 2001. Maternal transmission of infectious pathogens in breast milk. *J. Paediatr. Child. Health.* 37(6):576-82.

- Jonsson, S. ja Pulkkinen, M.O. 1994. Mastitis today: incidence, prevention and treatment. *Ann. Chir. Gynaecol. Suppl.* 208:84-7.
- Junqueira, L.C. ja Carneiro, J. 2003. *Basic Histology. Text & Atlas*, 10th edition, s. 466. McGraw-Hill, Inc., USA.
- Karra, M.V., Kirksey, A., Galal, O., Bassily, N.S., Harrison, G.G. ja Jerome, N.W. 1988. Zinc, calcium, and magnesium concentrations in milk from American and Egyptian women throughout the first 6 months of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 47(4):642-8.
- Kawada, M., Okuzumi, K., Hitomi, S. ja Sugishita, C. 2003. Transmission of *Staphylococcus aureus* between healthy, lactating mothers and their infants by breastfeeding. *J. Hum. Lact.* 19(4):411-7.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J. ja Saito, T. 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5(5):393-8.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S.E., Ezaki, T. ja Ohkuni, H. 1998. *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:921-927.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. ja Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1589-97.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1589-97.
- Kent, J.C., Mitoulas, L.R., Cregan, M.D., Ramsay, D.T., Doherty, D.A. ja Hartmann, P.E. 2006. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* 117(3):e387-95.
- Kirjavainen, P.V., Apostolou, E., Arvola, T., Salminen, S.J., Gibson, G.R. ja Isolauri, E. 2001. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.*
- Kruszewska, D., Sahl, H.G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S.O. ja Ljungh, A. 2004. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(3):648-53.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. ja Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20:699-722.
- Könönen, E. 2000. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann. Med.* 32(2):107-12.
- Lammi-Keefe, C.J. ja Jensen, R.G. 1984. Fat-soluble vitamins in human milk. *Nutr. Rev.* 42(11):365-71.

- Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leen, A.M. ja Burvenich, C. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69(3):145-59.
- Larsen, B. ja Monif, G.R. 2001. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect. Dis.* 32(4):e69-77.
- Law, B.J., Urias, B.A., Lertzman, J., Robson, D. ja Romance, L.J. 1989. Is ingestion of milk associated bacteria by premature infants fed raw human milk controlled by routine bacteriologic screening? *Clin. Microbiol.* 27(7):1560-6.
- Le Thomas, I., Mariani-Kurkdjian, P., Collignon, A., Gravet, A., Clermont, O., Brahimi, N., Gaudelus, J., Aujard, Y., Navarro, J., Beaufils, F. ja Bingen, E. 2001. Breast milk transmission of a Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 39(2):728-9.
- Leroy, F. ja de Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):974-81.
- Li, J., Aroutcheva, A.A., Faro, S., Chikindas, M.L. 2005. Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 13(3):135-40.
- Liepke, C., Zucht, H.D., Forssmann, W.G. ja Standker, L. 2001. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752(2):369-77.
- Lu, L. ja Walker, W.A. Related 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(6):1124S-1130S.
- Lääkelaitos. 2006. Voimassa olevat rohdosvalmisteiden myyntiluvat.
http://www.laakelaitos.fi/uploads/Laaketeollisuus/Rohdokset/Rohdosluettelo_2006_2_28.pdf.
- Lönnerdal, B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(6):1537S-1543S.
- Mandel, D., Lubetzky, R., Dollberg, S., Barak, S. ja Mimouni, F.B. 2005. Fat and energy contents of expressed human breast milk in prolonged lactation. *Pediatrics* 116(3):e432-5.
- Martin, R., Jimenez, E., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J. ja Rodriguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* In Press.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M., Olivares, M., Boza, J., Jimenez, J., Fernandez, L., Xaus, J. ja Rodriguez, J.M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 15(3-4):121-127.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Xaus, J., Fernandez, L. ja Rodriguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143(6):754-8.

- Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J. ja Rodriguez, J.M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21(1):8-17.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J.J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M. ja Martinez-Bueno, M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6):4245-9.
- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K. ja Kato, H. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 8(1):43-9.
- May, J.T. 1984. Antimicrobial properties and microbial contaminants of breast milk--an update. *Aust. Paediatr. J.* 20(4):265-9.
- May, J.T. 1994. Antimicrobial factors and microbial contaminants in human milk: recent studies. *J. Paediatr. Child. Health.* 30(6):470-5.
- McIntyre, J. 2006. Strategies to prevent mother-to-child transmission of HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19(1):33-8.
- McManaman, J.L. ja Neville, M.C. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55(5):629-41.
- Mepham, T.B. 1987. Physiology of lactation. Milton Keynes: Open University Press, Sratford, England.
- Michaelsen, K.F. 2005. Probiotics, breastfeeding and atopic eczema. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* (215):21-4.
- Michie, C., Lockie, F. ja Lynn, W. 2003. The challenge of mastitis. *Arch. Dis. Child.* 88(9):818-21.
- Michie, C.A. ja Gilmour, J. 2001. Breast feeding and the risks of viral transmission. *Arch. Dis. Child.* 84(5):381-2.
- Mikelsaar, M., Mändar, R., Sepp, E. ja Annuk, H. 2004. Human lactic acid microflora and its role in the welfare of the host. Kirjassa: Salminen, S., von Wright, A. ja Ouwenhand, A. (ed.), Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects, third edition. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Mota-Meira, M., Morency, H. ja Lavoie, M.C. 2005. In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(5):869-71.
- Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M. ja Morrow, A.L. 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* 25:37-58.
- Neville, M.C. ja Morton, J. 2001. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *J Nutr.* 131(11):3005S-8S.

- Neville, M.C., Allen, J.C., Archer, P.C., Casey, C.E., Seacat, J., Keller, R.P., Lutes, V., Rasbach, J. ja Neifert, M. 1991. Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 54(1):81-92.
- Newton, E.R. 2004. Breastmilk: the gold standard. *Clin. Obstet. Gynecol.* 47(3):632-42.
- Ng, D.K., Lee, S.Y., Leung, L.C., Wong, S.F. ja Ho, J.C. 2004. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J. Hosp. Infect.* 58(2):146-50.
- Nguyen, D.A., Parlow, A.F. ja Neville, M.C. 2001. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J. Endocrinol.* 170(2):347-56.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86(1):29-35.
- Novak, F.R., Da Silva, A.V., Hagler, A.N. ja Figueiredo, A.M. 2000. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. *J. Med. Microbiol.* 49(12):1109-17.
- Olafsdottir, A.S., Wagner, K.H., Thorsdottir, I. ja Elmadfa, I. 2001. Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. *Ann. Nutr. Metab.* 45(6):265-72.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M.P., Martin, R., Rodriguez, J.M. ja Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* 101(1):72-9.
- Olver, W.J., Bond, D.W., Boswell, T.C. ja Watkin, S.L. 2000. Neonatal group B streptococcal disease associated with infected breast milk. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 83(1):F48-9.
- Pag, U. ja Sahl, H.G. 2002. Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* 8(9):815-33.
- Parente, E. ja Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(5):628-38.
- Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P.A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., van Ree, R. ja Stobberingh, E.E. 2006. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA birth cohort study. *Gut*. Oct 17 (Elektroninen versio, lehti painossa).
- Petersen, F.C., Fimland, G. ja Scheie, A.A. 2006. Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.* 61(5):1322-34.
- Pittard, W.B., Anderson, D.M., Cerutti, E.R. ja Boxerbaum, B. 1985. Bacteriostatic qualities of human milk. *J. Pediatr.* 107(2):240-3.

- Pongtharangkul, T., Demirci, A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(3):268-72.
- Posfay-Barbe, K.M. ja Wald, E.R. 2004. Listeriosis. *Pediatr. Rev.* 25(5):151-9.
- Qutaishat, S.S., Stemper, M.E., Spencer, S.K., Borchardt, M.A., Opitz, J.C., Monson, T.A., Anderson, J.L. ja Ellingson, J.L. 2003. Transmission of *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics* 111(6 Pt 1):1442-6.
- Ramakrishnan, B. ja Qasba, P.K. 2001. Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the beta1,4-galactosyltransferase-I. *J. Mol. Biol.* 310(1):205-18.
- Ramsay, D.T., Kent, J.C., Hartmann, R.A. ja Hartmann, P.E. 2005. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *J. Anat.* 206(6):525-34.
- Ramsay, D.T., Kent, J.C., Owens, R.A. ja Hartmann, P.E. 2004. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics* 113(2):361-7.
- Rasmussen, K.M. ja Kjolhede, C.L. 2004. Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* 113(5):e465-71.
- Rautava, S., Arvilommi, H. ja Isolauri, E. 2006. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr. Res.* 60(2):221-4.
- Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):3763-6.
- Reid, G., Howard, J. ja Gan, B.S. 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* 9(9):424-8.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. ja Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2(4):361-7.
- Reunanen, J. ja Saris, P.E. 2003. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7):4214-8.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J. ja Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21(2):131-7.
- Risoen, P.A., Ronning, P., Hegna, I.K., Kolsto, A.B. 2004. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 96(4):648-55.
- Rocquelin, G., Tapsoba, S., Dop, M.C., Mbemba, F., Traissac, P. ja Martin-Prevel, Y. 1998a. Lipid content and essential fatty acid (EFA) composition of mature Congolese breast milk are influenced by mothers' nutritional status: impact on infants' EFA supply. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52(3):164-71.

- Rocquelin, G., Tapsoba, S., Mbemba, F., Gallon, G. ja Picq, C. 1998b. Lipid content and fatty acid composition in foods commonly consumed by nursing Congolese women: incidences on their essential fatty acid intakes and breast milk fatty acids. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 49(5):343-52.
- Rønnestad, A., Abrahamsen, T.G., Medbo, S., Reigstad, H., Lossius, K., Kaaresen, P.I., Egeland, T., Engelund, I.E., Irgens, L.M. ja Markestad, T. 2005. Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics* 115(3):e269-76.
- Saeed, S., Ahmad, S., Rasool, S.A. 2004. Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188. *Pak. J. Pharm. Sci.* 17(1):1-8 (abstrakti).
- Sahl, H.G. ja Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:41-79.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ja Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2. painos, Cold Spring Harbor laboratory press, New York, USA.
- Schillinger, U. ja Lucke, F.K 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8):1901-6.
- Schleiss, M.R. 2006. Acquisition of human cytomegalovirus infection in infants via breast milk: natural immunization or cause for concern? *Rev. Med. Virol.* 16(2):73-82.
- Schägger, H. ja von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2):368-79.
- Sears, P.M., Smith, B.S, Stewart, W.K., Gonzalez, R.N., Rubino, S.D., Gusik, S.A., Kulisek, E.S., Projan, S.J. ja Blackburn, P. 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J. Dairy Sci.* 75(11):3185-90.
- Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(4):405-40.
- Sharma, N., Kapoor, G. ja Neopanay, B. 2006. Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89(3-4):337-43.
- Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., Gorbach, S.L. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(8):1231-3.
- Sinkiewicz, G. ja Nordström, E.A. 2005. Occurrence of *Lactobacillus reuteri*, lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk. *Pediatr. Res.* 58:415, abstrakti 353.
- Spellerberg, B. 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes. Infect.* 2(14):1733-42.
- Strauss, E. 2000. Fighting bacterial fire with bacterial fire. *Science* 290(5500):2231-3.

- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. ja Schnurer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9):4322-7.
- Tagg, J.R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.* 119 Suppl:13-6 (abstrakti).
- Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesova, A. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93(2-3):97-108.
- Trabi, M. ja Craik, D.J. 2002. Circular proteins--no end in sight. *Trends Biochem. Sci.* 27(3):132-8.
- Uehara, Y., Kikuchi, K., Nakamura, T., Nakama, H., Agematsu, K., Kawakami, Y., Maruchi, N. ja Totsuka, K. 2001. H(2)O(2) produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin. Infect. Dis.* 32(10):1408-13.
- Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T. ja Messer, M. 2001. Oligosaccharides of milk and colostrums in non-human mammals. *Glycoconj. J.* 18(5):357-71.
- van der Ploeg, J.R. 2005. Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J. Bacteriol.* 187(12):3980-9.
- Ward, R.E., Ninonuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B. ja German, J.B. 2006. *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6):4497-9.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U. ja Molin, G. 2002. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* 40(8):2746-9.
- Venkatesh, M.P., Placencia, F. ja Weisman, L.E. 2006. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 17(3):120-7.
- Wescombe, P.A., Upton, M., Dierksen, K.P., Ragland, N.L., Sivabalan, S., Wirawan, R.E., Inglis, M.A., Moore, C.J., Walker, G.V., Chilcott, C.N., Jenkinson, H.F. ja Tagg, J.R. 2006. Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2):1459-66.
- Vescovo, M., Scolari, G. ja Zacconi, C. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 23(7):689-93.
- West, P.A., Hewitt, J.H. ja Murphy, O.M. 1979. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol.* 46(2):269-77.

- WHO. 2000. Mastitis: causes and management. World Health Organization, http://http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/NUTRITION/WHO_FCH_CAH_00_13.PDF.
- WHO. 2004. HIV transmission through breastfeeding - a review of available evidence. World Health Organization, http://www.who.int/nutrition/publications/HIV_IF_Transmission.pdf.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W. ja Tagg, J.R. 2006. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Nisin Variant Produced by *Streptococcus uberis*. Appl. Environ. Microbiol. 72(2):1148-1156.
- Vos, M.C. ja Verbrugh, H.A. 2005. MRSA: We can overcome, but who will lead the battle? Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 26(2):117-20.
- Wright, J. 1947. Bacteriology of the collection and preservation of human milk. Lancet 2:121-124.
- Wright, K.C. ja Feeney, A.M. 1998. The bacteriological screening of donated human milk: laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. J. Infect. 36(1):23-7.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Driessche, G.V., Devreese, B., Beeumen, J.V., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. ja Drosinos, E.H. 2006. Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. Antonie Van Leeuwenhoek 89(1):19-26.
- Yan F, Polk DB. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. Curr. Opin. Gastroenterol. 20(6):565-71.
- Yang, R., Johnson, M.C. ja Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58(10):3355-9.
- Yildirim, Z. ja Johnson, M.G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris R isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol. 26(4):297-304.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. ja Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(7):1616-9.
- Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E. ja de Vos, W.M. 2006. A microbial world with us. Mol. Microbiol. 59(6):1639-50.